

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. M. Tiedge

**Einfluss der mitochondrialen *Atp8*-Mutation des Atmungskettenkomplex V
(ATP Synthase) im B6-mt^{FVB} Mausstamm auf metabolische
Kompensationsmechanismen nach Applikation einer Hochfettdiät**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Tobias Wilfer

geboren am 02. Juli 1988 in Rostock,

aus Rostock

Rostock, Februar 2015

Dekan: Prof. Dr. E. Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Tiedge

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. S. Willenberg

Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Sektion Endokrinologie,
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. U. Lendeckel

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Universität Greifswald

Tag der Einreichung: 04.03.2015

Tag der Verteidigung: 27.01.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Metabolisches Syndrom	1
1.1.1 Die Mausstämme C57BL/6J, FVB/N und AKR/J und ihre Eignung zur Untersuchung der Suszeptibilität für metabolische Störungen	4
1.2 Mitochondrien	5
1.2.1 Aufbau	5
1.2.2 Atmungskette und Oxydative Phosphorylierung.....	6
1.2.3 Mitochondriales Genom	10
1.2.4 Mitochondriopathien	11
1.3 Insulin und Leptin.....	14
1.3.1 Extra- und intrapankreatische Einflussfaktoren auf die Insulinsynthese und Insulinsekretion	14
1.3.2 Der Einfluss des Adipokins Leptin auf metabolische Stoffwechselwege und seine funktionelle Rolle im Organismus.....	15
1.4 Steatosis hepatis und Lipidmetabolismus.....	17
1.4.1 Entstehung einer Steatosis hepatis und ihre Einflussfaktoren	17
1.4.2 Lipolyse und Blutlipidparameter	19
1.5 Adaptation der hämatopoietischen Zellen an das Nahrungsangebot	20
1.6 Fragestellung	22
2 Materialien und Methoden	23
2.1 Materialien.....	23
2.2 Tiere und Tierhaltung	25
2.3 Lipidbelastungsstudie	26
2.3.1 Blutentnahme aus der Schwanzvene und Blutglucosebestimmung.....	27
2.3.2 Retrobulbäre Blutentnahme	27
2.3.3 Bestimmung des Körpergewichtes	27
2.4 Bestimmung des Insulingehaltes im Serum.....	28
2.4.1 Proben und Ablauf.....	29
2.5 Bestimmung des Leptingehaltes im Serum	29
2.5.1 Proben und Ablauf.....	31
2.6 Blutlipidparameter und Blutbild	32
2.6.1 Bestimmung der Blutlipidparameter	32

2.6.2	Erstellen der Blutbilder.....	32
2.7	Triglyceride und Proteingehalt der Leber.....	32
2.7.1	Herstellen der Proben	32
2.7.2	Ermittlung des Triglyceridgehaltes der Leber	33
2.7.3	Spezifische Methode der Messung.....	34
2.7.4	Bestimmung der Proteinmenge	35
2.7.5	Spezifische Methode der Messung.....	36
2.8	Histologische Untersuchungen zur Bestimmung der β -Zellmasse.....	37
2.8.1	Herstellen der Präparate.....	37
2.8.2	Immunfluoreszenz für Paraffinschnitte	38
2.8.3	Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	39
2.8.4	Berechnung der β -Zellmasse	39
2.9	Statistische Auswertung und Graphiken.....	40
3	Resultate.....	41
3.1	Lipidbelastungsstudie der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere.....	41
3.1.1	Gewichtsverlauf der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere.....	41
3.1.2	Blutglucose	43
3.1.3	Seruminsulinspiegel der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Maus.....	45
3.1.4	β -Zellmasse.....	46
3.1.5	Plasmaleptinspiegel der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Maus.....	49
3.2	Blutbilder.....	52
3.2.1	Erythrozyten	52
3.2.2	Leukozyten	53
3.3	Blutlipidparameter Cholesterin und Triglyceride der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter fettreicher und Kontrolldiät.....	58
3.3.1	Cholesterin im Vollblut der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter fettreicher und Kontrolldiät.....	58
3.3.2	Triglyceridkonzentration im Vollblut der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter fettreicher und Kontrolldiät	62
3.3.3	Triglyceridkonzentration der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere in der Leber.....	65
4	Diskussion.....	69
4.1	Auswirkung der <i>mt-Atp8</i> -Genvariante auf die Adaptation metabolischer Parameter des Metabolischen Syndroms der C57BL/6J-Maus.....	70
4.1.1	Der Lipidmetabolismus der B6-Maus und der Einfluss des <i>mt-Atp8</i> -Gens.....	71
4.1.2	Der Einfluss des <i>mt-Atp8</i> -Gens auf den Cholesterinspiegel der B6-Maus.....	72
4.2	Adaptation des Insulinspiegels unter dem Einfluss des <i>mt-Atp8</i> -Gens	73
4.3	Auswirkung der mitochondrialen Genvariante auf die Adaptation der β -Zellmasse	76

4.4	Auswirkung der mitochondrialen Genvariante auf den Leptinspiegel	79
4.5	Auswirkungen der Genvariante des <i>mt-Atp8</i> -Gens auf die Lipidakkumulation in der Leber und Ausbildung einer Steatosis hepatis.....	83
4.6	Hämatologische Adaptation der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Maus.....	86
4.7	Ausblick.....	91
5	Zusammenfassung.....	93
	Literaturverzeichnis.....	95
	Thesen	105
	Danksagung.....	108
	Eidesstattliche Erklärung.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Modell der mitochondrialen Membranstruktur.....	6
Abb. 1.2	Übersicht der Atmungskette.....	7
Abb. 1.3	Mitochondriales Genom.....	10
Abb. 1.4	Übersichtsmodell der Glucose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS).....	15
Abb. 1.5	Pathogenese der Lebersteatose.....	18
Abb. 2.1	Mitochondriales Genom	25
Abb. 3.1	Gewichtsverlauf der weiblichen B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere.....	42
Abb. 3.2	Gewichtsverlauf der männlichen B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere.....	43
Abb. 3.3	Blutglucoseverlauf der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere	44
Abb. 3.4	Seruminsulinkonzentrationen der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD und CD	45
Abb. 3.5	β-Zellmasse der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD und CD.....	46
Abb. 3.6	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Inselnflächen nach immunhistochemischer Färbung von Insulin der B6-mt ^{FVB} Tiere unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten.....	47
Abb. 3.7	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Inselnflächen nach immunhistochemischer Färbung von Insulin der B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten.....	48
Abb. 3.8	Plasmaleptinkonzentrationen der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten.....	50
Abb. 3.9	Plasmaleptinkonzentrationen der weiblichen B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten	51
Abb. 3.10	Plasmaleptinkonzentrationen der männlichen B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten	51
Abb. 3.11	Anzahl der Erythrozyten der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD	52
Abb. 3.12	Anzahl der Leukozyten der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD	53
Abb. 3.13	Anteil der neutrophilen Granulozyten der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD	54
Abb. 3.14	Anteil der Lymphozyten der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD	55

Abb. 3.15	Anteil der Monozyten der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD.	56
Abb. 3.16	Anzahl der eosinophilen Granulozyten der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD	57
Abb. 3.17	Plasmacholesterinkonzentrationen der Stämme B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten	59
Abb. 3.18	Plasmacholesterinkonzentrationen der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD nach 3 und 6 Monaten	61
Abb. 3.19	Plasmacholesterinkonzentrationen der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter CD nach 3 und 6 Monaten	61
Abb. 3.20	Plasmatriglyceridkonzentrationen der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD und CD	62
Abb. 3.2	Plasmatriglyceridkonzentrationen der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter HFD nach 3 und 6 Monaten	64
Abb. 3.22	Plasmatriglyceridkonzentration der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere unter CD nach 3 und 6 Monaten	64
Abb. 3.23	Triglyceridkonzentration der B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere in der Leber unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten	66
Abb. 3.24	Triglyceridkonzentration der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere in der Leber unter HFD und CD nach 3 Monaten.....	67
Abb. 3.25	Triglyceridkonzentration der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt ^{FVB} und B6-mt ^{AKR} Tiere in der Leber unter HFD und CD nach 6 Monaten.....	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Diagnostische Kriterien des Metabolischen Syndroms (modifiziert nach Emanuela et al 2012 und Eckel et al 2005).....	1
Tab. 1.2	Erkrankungen auf dem Boden einer Mitochondriopathie / mitochondrialen Dysfunktion (modifiziert nach Larsson und Luft 1999 und Wallace 1999)....	13

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
~	ungefähr
®	Registered Trademark
♀	weiblich
♂	männlich
µg	Mikrogramm
µg/l	Mikrogramm pro Liter
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
α	Alpha
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	American Heart Association
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-Synthase
β	Beta
B6-mt ^{AKR}	Mausstamm C57BL/6J-mt ^{AKR/J}
B6-mt ^{FVB}	Mausstamm C57BL/6J-mt ^{FVB/N}
BCA	Bicinchoninsäure
BD	Blutdruck
BSA	bovines Serumalbumin

BU	Bauchumfang
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cal	Kalorien
CAL	Kalibrator
CD	Kontrolldiät
CD	Cluster of Difference
Chol.	Cholesterin
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym-A
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CPEO	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
Cu	Kupfer
δ	Delta
dest.	destillata
diast.	Diastolisch
dl	Deziliter
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
DOA	autosomal dominante optische Atrophie Typ 1
ε	Epsilon
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAD	Flavinadenindinukleotid
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association

γ	Gamma
g	Gramm
GK	Glycerol-Kinase
GLUT	Glukosetransporter
Gr.	Größe
GPO	Glycerol-3-Phosphat Oxidase
GSIS	Glucose-stimulierte Insulinsekretion
h	Stunden
H^+	Proton / Wasserstoff-Ion
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HB	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDL	high-density Lipoprotein
HFD	Hochfettdiät
HRP	horse-radish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSL	Hormonsensitive Lipase
IDF	International Diabetes Federation
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRS	Insulinrezeptorsubstrate
K_{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LDL	low-density Lipoprotein
Leu	Leucin
LHON	Leber'sche hereditäre Optikusatrophie
Lys	Lysin

M	Molar
MAP	mitogen-activated Protein
MELAS	Mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose, schlaganfallähnliche Episoden
MERRF	myoklone Epilepsie mit regged red fibres
MNGIE	Mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie
m	männlich
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	mitochondriale Matrix
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol pro Liter
mRNA	messenger-RNA
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Anzahl
nm	Nanometer
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
nDNA	nukleäre DNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n. s.	nicht signifikant
o.	oder

O ₂	Sauerstoff
ob	obesity
OH [·]	Hydroxylradikal
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
P _i	Orthophosphat
pH	potentia hydrogenii
POD	Peroxidase
QC	Qualitätskontrolle
reg	regulatorisch
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA
s.	siehe
S.	Seite
SEM	Standard error of the mean
syst.	systolisch
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
TG	Triglyceride
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	trademark
TMB	Tetramethylbencidin
tRNA	transfer-RNA
TNF	Tumornekrosefaktor
Tyr	Tyrosin
u.	und
U	units
U/ml	Units pro Milliliter

u.a.	unter anderem
UCP	Uncoupling protein
UE	Untereinheit
UQ	Ubichinon
u. U.	unter Umständen
Val	Valin
VLDL	very-low-density Lipoprotein
vs.	versus
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Metabolisches Syndrom

Das ‚Metabolische Syndrom‘ umfasst verschiedene klinische Faktoren, die das Risiko zur Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen und eines Diabetes mellitus Typ II (T2DM) erhöhen (Emanuela et al 2012). Dabei existieren verschiedene Definitionen, die im Wesentlichen ähnliche Kriterien beinhalten. Die primäre Beschreibung eines Metabolischen Syndroms geht auf Reaven im Jahr 1988 zurück. Er beschrieb als ‚Syndrom X‘ die Assoziation einer Insulinresistenz, Hyperglykämie, Hypertonie, geringem HDL-Cholesterin und erhöhten VLDL-Triglyceriden (Reaven 1988). In seiner Definition berücksichtigt er jedoch nicht das Übergewicht, insbesondere die Vermehrung des viszeralen Fettgewebes, was heute als essentielles Kriterium für die Prädisposition eines Metabolischen Syndroms angesehen wird (Eckel et al 2005). Folgende Tabelle zeigt die diagnostischen Kriterien eines Metabolischen Syndroms (Tab. 1.1).

Risikofaktoren (RF)	AHA (2005)	IDF (2005)
Bauchumfang (BU)	♂ ≥ 102 cm, ♀ ≥ 88 cm	♂ ≥ 90 cm, ♀ ≥ 80 cm
Blutdruck (BD)	syst. BD ≥ 130 u./o. diast. BD ≥ 85 mmHg	syst. BD ≥ 130 u./o. diast. BD ≥ 85 mmHg o. behandelter Hypertonus
Nüchternplasmaglucoese	≥ 6.1 mmol/l	≥ 5.6 mmol/l o. diagnostizierter T2DM
Triglyceride (TG)	≥ 1.7 mmol/l (≥ 150 mg/dl)	≥ 1.7 mmol/l (≥ 150 mg/dl) o. behandelte Hyper-TG
HDL-Cholesterin	♂ < 1.03 mmol/l (< 40 mg/dl) ♀ < 1.29 mmol/l (< 50 mg/dl)	♂ < 1.03 mmol/l (< 40 mg/dl) ♀ < 1.29 mmol/l (< 50 mg/dl) o. behandelte Hyper-Cholesterin
Metabolisches Syndrom Definitionen	mindestens 3 RF	BU + 2 o. mehr RF

Tab. 1.1 Diagnostische Kriterien des Metabolischen Syndroms (modifiziert nach Emanuela et al 2012 und Eckel et al 2005)

AHA: American Heart Association; IDF: International Diabetes Federation

Bjorntorp suggerierte den Begriff „Metabolisches Syndrom“ als sogenanntes „Zivilisationssyndrom“, da hierfür Lebensgewohnheiten wie der Konsum hochkalorischer Nahrungsmittel und große Nahrungsmengen bei gleichzeitig wenig körperlicher Aktivität eine essentielle Rolle spielen (Bjorntorp 1992). Das Fettgewebe steht in enger Verbindung mit immunologischen Prozessen, die auch für die Ausbildung metabolischer Syndrome konditionieren. Es besteht eine gegenseitige Abhängigkeit zwischen metabolischen Regulationen und Immunantworten des Körpers (Hotamisligil 2006). Nur einige Mediatoren der klassischen Inflammation werden durch metabolische Prozesse sowie Nahrungsbestandteile induziert, weswegen auch der Begriff ‚Metaflammation‘ (metabolically triggered inflammation) geprägt wird (Hotamisligil 2006). Hierbei ist die Anatomie von wesentlicher Bedeutung. Fettgewebe und die Leber haben eine histologische Struktur, bei der metabolische Zellen (Adipozyten oder Hepatozyten) in direkter Nachbarschaft zu Immunzellen (Kupfferzellen oder Makrophagen, Lymphozyten) stehen und durch die starke Vaskularisierung Anschluss an das Blutsystem haben. Das ermöglicht eine Interaktion mit Nachbarorganen wie dem Pankreas. Das von den β -Zellen des Pankreas gebildete Insulin wirkt u.a. auf die Adipozyten sowie die Leber und die Produktion wird über Feedbackschleifen (Senkung der Blutglucose; Anstieg intrazellulärer Lipide) gehemmt. Eine Dysfunktion dieser Signalübermittlung führt zu metabolischen Störungen, die den Zusammenhang zwischen Übergewicht und einem T2DM erklären (Shoelson et al 2006; Wellen and Hotamisligil 2005).

Im Folgenden soll dargestellt werden, wie die einzelnen Kriterien des Metabolischen Syndroms im Zusammenhang stehen:

Eine konsequente Hochfettdiät (HFD) führt zu einer Zunahme intrazellulärer Lipide und zu einer Hyperplasie der Adipozyten (Fex et al 2007). Nach intestinaler Resorption erfolgt der Metabolismus der Nahrungsbestandteile. Triglyceridreiche Substrate werden über die mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren, die Kohlenhydrate im Endschrift über die Glycolyse metabolisiert (Wu et al 2013). Insulin induziert die Glycolyse und hemmt zugleich die Lipolyse, wodurch vermehrt Lipide in Adipozyten eingelagert werden (Delarue and Magnan 2007). Das von den Adipozyten gebildete Leptin wirkt dabei als funktioneller Gegenspieler des Insulins und hemmt die Insulinwirkung (Friedman and Halaas 1998). Durch eine konsequente HFD kommt es zu einer Steigerung der Atmungskettenaktivität (Facundo et al 2007), die in Verbindung mit den genannten metabolischen Prozessen zu einer Imbalance und Dysfunktion im Metabolismus führt. Es resultieren Adipositas, eine Leptin- und

Insulinresistenz mit konsekutivem T2DM, eine Steatosis hepatis und weitere Symptome des Metabolischen Syndroms (siehe Tab. 1.1, S. 1).

Als wesentlichen Pathomechanismus der Entstehung eines T2DM im Rahmen eines Metabolischen Syndroms spielen oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktionen eine Rolle (Furukawa et al 2004; Lin et al 2005; Lowell and Shulman 2005). Hierbei aktivieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die bei mitochondrialer Dysfunktion verstärkt anfallen, neben Zytokinen und Lipidmediatoren den ‚c-Jun amino-terminal Kinase‘-Signalweg. Das führt zur Serinphosphorylierung der ‚Insulin-Rezeptor-Substrate 1 und 2‘ (IRS-1/2) und somit zur Inhibition der Insulinwirkung. In der Konsequenz entstehen eine Insulinresistenz, eine Steatosis hepatis und ein Diabetes mellitus (Hirosumi et al 2002; Prada et al 2005).

Adipositas, Insulinresistenz und T2DM sind mit einer chronischen Inflammation assoziiert, bei der es zu einer gesteigerten Produktion von Zytokinen, Akute-Phase-Proteine und anderer Mediatoren kommt (Wellen and Hotamisligil 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass von den Adipozyten fettleibiger Mäuse der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und Adiponektin verstärkt exprimiert werden (Hotamisligil et al 1993; Karastergiou and Mohamed-Ali 2010). Dadurch wird die Insulinsensitivität gesenkt und der Glucosemetabolismus gehemmt (Uysal et al 1997; Ventre et al 1997). Eine chronische Überproduktion des TNF- α bedingt somit eine Insulinresistenz (Hotamisligil et al 1995; Kern et al 1995; Saghizadeh et al 1996).

Adipozyten produzieren chemotaktische Mediatoren, die zu einer gesteigerten Rekrutierung von Makrophagen führen und die resultierende Inflammation eine gesteigerte Synthese und Infiltration von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen bedingt (Weisberg et al 2003; Wellen and Hotamisligil 2005; Xu et al 2003). Insbesondere exprimieren Adipozyten ‚Toll-like-Rezeptoren‘ (TLR), die durch Nährstoffe und Fettsäuren aktiviert werden (Shi et al 2006; Song et al 2006). Die TLR inhibieren die Aktivität sogenannter ‚liver X Rezeptoren‘ in Makrophagen, was zu einer Akkumulation des Cholesterins führt und proatheriosklerotisch wirkt (Castrillo et al 2003).

Der geschilderte Zusammenhang der einzelnen Risikofaktoren und diagnostischen Kriterien war Ausgangspunkt der in dieser Arbeit untersuchten metabolischen Parameter. In vorherigen Studien konnte für die Mutation des *mt-Atp8-Gens* bereits der Einfluss auf die Suszeptibilität eines T2DM (Weiss et al 2012) und auf ein erhöhtes adaptives Potential CD4 T-Zellen bei Beeinträchtigung der Oxidativen Phosphorylierung gezeigt werden (Yu et al 2009b). Es sollte geschaut werden, wie sich die *mt-Atp8-Genvariante* auf die jeweiligen metabolischen

Parameter auswirkt und welchen Einfluss sie auf die Entwicklung metabolischer Störungen nimmt.

1.1.1 Die Mausstämme C57BL/6J, FVB/N und AKR/J und ihre Eignung zur Untersuchung der Suszeptibilität für metabolische Störungen

Der Hintergrundstamm C57BL/6J (B6) ist der bevorzugte Inzuchtmausstamm für die Erzeugung und Analytik transgener und knockout-Mäuse (Zurita et al 2011). Nach Induktion genetischer Besonderheiten wird er häufig für Tierstudien zu menschlichen Erkrankungen verwendet.

Physiologisch und biochemisch zeigt der B6-Stamm geringe Konzentrationen an Plasmacholesterin (Weibust 1973) und Plasmatriglyceriden (Jiao et al 1990). Daneben fällt eine hohe Leukozytenzahl neben geringer Erythrozytenzahl auf (Russell et al 1951). Unter metabolischer Belastung hingegen zeichnet sich die B6-Maus durch ein besonderes Verhalten bezüglich spontan ausgebildeter Erkrankungen auf. Es besteht eine Suszeptibilität gegenüber Atherosklerose nach 20 Wochen Fütterung einer Hochfettdiät (HFD) (Paigen et al 1985; Roberts and Thompson 1976). Der Stamm entwickelt einen T2DM und Hypertonus unter Fütterung einer HFD mit einem hohen Anteil an einfachen Kohlenhydraten (Mills et al 1993). Daneben entwickeln B6-Mäuse nach langer Fütterungsdauer einer HFD über fünf Monate eine Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Hypercholesterinämie als Folgen des metabolischen Charakters viszeralen Fettgewebes (Rebuffe-Scrive et al 1993). Als Ursache dieser Suszeptibilität wird die schnellere und effektivere Hyperplasie der Adipozyten bereits ohne vermehrte Kalorienzufuhr angenommen (Surwit et al 1991).

Der reine FVB/N Stamm zeigt eine geringere Suszeptibilität gegenüber Adipositas und daraus resultierenden Schäden wie Gewebehypoxie und Lipidtoxizität (Kim, Gutierrez-Aguilar et al. 2013). Auch bei geringerer Adipozytenzahl zeigt der FVB/N-Stamm eine durch HFD induzierbare Steatosis hepatis und Insulinresistenz bei erhöhten Konzentrationen freier Fettsäuren im Plasma (Chen, Liu et al. 2005). Es wird eine verstärkte Expression der „Diacylglycerol-Acyltransferase 1“ vermutet, wodurch die Lipotoxizität gesenkt wird (Chen, Liu et al. 2005).

Der reine AKR/J-Stamm entwickelt eine mit dem B6-Stamm vergleichbare Adipositas, jedoch entwickelt er schneller eine Insulinresistenz mit erhöhten Plasmainsulinspiegeln (Rossmeisl, Rim et al. 2003). Durch eine HFD kommt es bei diesem Mausstamm zu steigender Lipidbelastung, aber gleichzeitig geringeren Blutglucosespiegeln und geringerer

Hyperglykämie (West, Boozer et al. 1992). Der AKR/J-Stamm hat vergleichsweise niedrige Level an freien Fettsäuren und Triglyceriden im Plasma sowie eine verminderte hepatische Gluconeogenese (Rossmeisl, Rim et al. 2003).

Aufgrund dieser Besonderheiten war die Verwendung dieser Mausstämmen nach Kreuzung geeignet für die in dieser Arbeit untersuchten metabolischen Kompensationsmechanismen. Der C57BL/6J-Hintergrundstamm spielt eine wichtige Rolle bei der Untersuchung des Zusammenhangs genetischer Konditionen und metabolischer Belastung bei der Entwicklung metabolischer Syndrome (Collins et al 2004). Durch die Übertragung der mtDNA des AKR/J-Stamms bzw. des FVB/N-Stamms auf den Hintergrundstamm, war es möglich, den Einfluss der mitochondrialen Genvariante auf metabolische Adaptationsprozesse zu untersuchen.

1.2 Mitochondrien

1.2.1 Aufbau

Die Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in den metabolischen Prozessen der aeroben Organismen. Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine Dicke von 1µm und eine variable Länge (Löffler 2007). Diese hochdynamischen Organellen sind von zwei Membranen umgeben, wodurch sie in zwei Kompartimente unterteilt werden (s. Abb. 1.1). Zwischen der inneren und der äußeren Membran befindet sich der Intermembranraum und im Inneren der Matrixraum (Logan 2006). Die Außenmembran ist dabei eine semipermeable Membran, die verschiedene Stoffwechselintermediate passieren lässt, gefaltete Proteine jedoch nicht. In der Innenmembran sind die Komplexe I-IV der Atmungskette, der Komplex V der Oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), das Ubichinon, die Succinat-Dehydrogenase des Citrat-Zyklus, die Adeninnukleotidtranslokase und weitere Transportsysteme lokalisiert. Der Intermembranraum enthält das Hämprotein Cytochrom C, einen wesentlichen Bestandteil der Atmungskette. Kommt es zu einer Schädigung der äußeren Membran, wird dieses ins Zytosol freigesetzt und löst dort einen Caspasen-abhängigen Zyklus der Apoptose aus. Der Matrixraum, der seine wesentliche Funktion in der Faltung der Proteine sowie der proteolytischen Spaltung importierter Proteine hat, enthält die Enzymsysteme für den Abbau von Keto-, Fett- und Aminosäuren, des Weiteren einen Teil der Häm-biosynthese und der Ammoniakentgiftung. Neben diesen katabolen Prozessen findet hier die Replikation,

Transkription sowie die mitochondriale Proteinbiosynthese statt, wodurch 13 hydrophobe Polypeptidbestandteile der Komplexe I und III-V der Innenmembran entstehen (Löffler 2007).

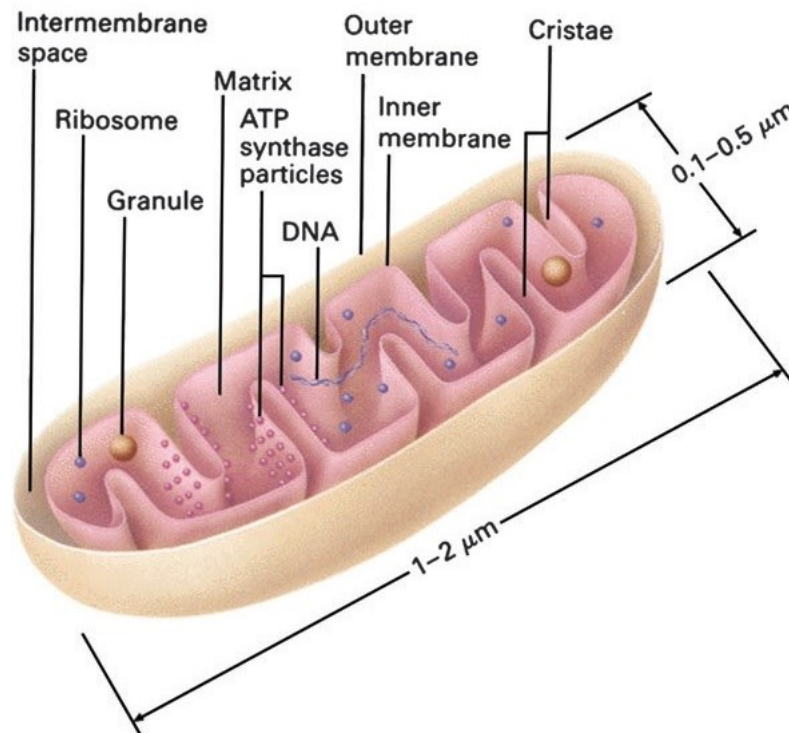


Abb. 1.1 Modell der mitochondrialen Membranstruktur

Die Abbildung zeigt ein Modell der mitochondrialen Membranstruktur mit den molekularen Bestandteilen. Die Außenmembran (Outer membrane) wird von der Innenmembran (Inner membrane) durch den Intermembranären Raum (Intermembrane space) getrennt. Die Innenmembran erhält durch die Cristae eine Faltenstruktur. In dem Matrixraum (Matrix) befinden sich die mtDNA (DNA), Ribosomen (Ribosome), Granula (Granule) und ATP-Synthasepartikel (ATP synthase particles) (Logan 2006).

Neben den über 1500 nukleär kodierten Proteinen verfügen Mitochondrien über 13 durch mitochondriale DNA (mtDNA) kodierte Proteine. Die mtDNA kodiert OXPHOS-Untereinheiten, aber auch tRNAs und rRNAs (Park et al 2012; Sauvanet et al 2012).

1.2.2 Atmungskette und Oxydative Phosphorylierung

Das ATP, welches Energieträger für die verschiedenen metabolischen Prozesse eukaryoter Lebewesen ist, wird über die in den Mitochondrien lokalisierte oxidative Phosphorylierung

(Sauvanet et al 2012) synthetisiert (Kagawa 2010). Daneben haben die Mitochondrien wesentlichen Einfluss auf die Calciumhomöostase, die Apoptose sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Begriffe et al 2006). Diese Komplexität zeigt, dass eine Dysfunktion der oxydativen Phosphorylierung die Mechanismen vieler Pathologien bestimmt. Hierzu zählen insbesondere Alterungsprozesse und altersbedingte Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und Friedreich Ataxie (Gouspillou et al 2011).

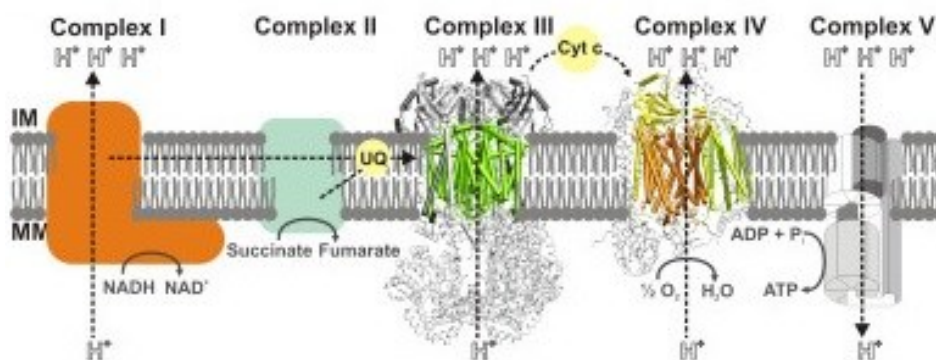


Abb. 1.2 Übersicht der Atmungskette

Die Abbildung zeigt eine Übersicht der Komplexe der Atmungskette. Komplex I (NADH Dehydrogenase) und II (Succinat Dehydrogenase) erhalten Elektronen entweder von NADH oder FADH_2 . Die Elektronen werden durch das Koenzym Q/Ubichinon (UQ) und Cytochrom C (CYC) zwischen den Komplexen transportiert. Das energetische Potential des Elektronentransfers wird genutzt, um Protonen entgegen dem elektrochemischen Gradienten zu pumpen. Protonen gelangen von der mitochondrialen Matrix (MM) in den Intermembranspalt (IM) [Komplex I und III (Cytochrom bc_1) und IV (Cytochrom-c-Oxidase)]. Die ATP-Synthese durch den Komplex V (ATP Synthase) wird durch den Protonengradienten ermöglicht und erfolgt in der mitochondrialen Matrix (da Fonseca et al 2008).

Der Komplex I (NADH-Dehydrogenase, NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase) ist der erste und gleichsam größte Enzymkomplex der Atmungskette. Sieben der insgesamt 13 durch die mitochondriale DNA kodierten Untereinheiten des Enzymkomplexes finden sich in der NADH-Dehydrogenase (Marella et al 2013). Dieser erste Komplex hat zwei funktionelle Seiten (Quinlan et al 2013) und katalysiert den ersten Schritt bei der NADH-Oxidation (s. Abb. 1.2). Hier wird die NAD^+/NADH -Ratio erhöht und Protonen über die innere

Mitochondrienmembran geschleust (Santidrian et al 2013). Dieses geschieht durch die Oxidation des aus verschiedenen Abbauvorgängen hervorgegangenen $\text{NADH} + \text{H}^+$, wobei das dabei frei werdende Elektronenpaar auf das Ubichinon übertragen wird. Bei diesem Prozess werden insgesamt 4 Protonen über die Innenmembran in den Intermembranraum gebracht, wodurch ein elektrochemischer Gradient entsteht (da Fonseca et al 2008).

Der Komplex II der Atmungskette (Succinat-Dehydrogenase), der als kleinster Enzymkomplex gilt, besteht aus vier Untereinheiten, davon zwei lösliche (Flavoprotein- und Eisen-Schwefel-Untereinheit) und zwei membranintegrierte. Die Flavoproteinuntereinheit enthält FAD als prosthetische Gruppe, die Eisen-Schwefel-Untereinheit enthält drei Eisen-Schwefel-Cluster (Sakai et al 2013). Dadurch entstehen zwei funktionelle Seiten, zum einen die Oxidation von Succinat zu Fumerat (Citratzyklus), bei der die Elektronen auf FADH_2 übertragen werden, und zum anderen der Elektronentransport von FADH_2 zu Ubichinon (Atmungskette). Dadurch entsteht eine direkte Verbindung zwischen diesen beiden katalytischen Prozessen (Iverson et al 2012).

Der Komplex III (Cytochrom b, Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) besteht aus der mtDNA codierten Cytochrom b Untereinheit. Mit Hilfe des Q-Zyklus katalysiert dieser Komplex der Atmungskette die Elektronenübertragung auf der matrixfernen Seite (q_0) von Ubihydrochinon auf Cytochrom c. Dabei übergibt das Ubihydrochinon ein Elektron mittels des Eisen-Schwefel-Proteins und des Cytochrom c_1 an das Cytochrom c. Über die Hämproteine b_L und b_H wird ein weiteres Elektron der matrixnahen Seite (q_1) auf ein Ubichinon bzw. ein Ubisemichinon übertragen. Da jedes Cytochrom c nur ein Elektron binden kann, muss für einen kompletten Q-Zyklus dieser Prozess zweimal ablaufen, um mittels zwei Elektronen ein Molekül Ubihydrochinon zu regenerieren. Somit kommt es innerhalb des Komplex III zu einem Protonenübergang von 4 Protonen über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum (da Fonseca et al 2008).

Der Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) ist der letzte für den Elektronentransport wichtige Atmungskettenkomplex. Dieser besteht neben 10 nukleären aus 3 mtDNA codierten Untereinheiten und ist gleichsam der dritte Komplex mit einem Protonentransport in den Intermembranraum (Johar et al 2013). In diesem letzten Prozess werden vier reduzierte Cytochrom c Moleküle oxidiert, sodass dabei frei werdende Elektronen unter Bildung von H_2O auf $\frac{1}{2} \text{O}_2$ übertragen werden (Jimenez-Gutierrez et al 2013).

Die ATP-Synthase (ATPase), die den Komplex V der Atmungskette darstellt, bildet mittels des aus den Komplexen I-IV entstandenen elektrochemischen Gradienten ATP aus ADP und P_i . Sie besteht aus zwei Domänen, dem katalytischen F_1 -Teil, der aus drei Kopien der

Untereinheiten α und β sowie je einer Kopie der Untereinheiten γ , δ und ϵ aufgebaut und in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist und den als Protonenkanal fungierenden F_O -Teil in der inneren Mitochondrienmembran. Durch die Untereinheiten des F_1 -Teils wird die Konformation der ATPase bestimmt und mit der Basis des F_O -Teils verankert. Durch den katalytischen Einfluss wird ATP synthetisiert, was durch die drei Konformationsstadien der β -Untereinheiten (offen, locker, geschlossen) in rotierender Form geschieht (Zhang et al 2013). Der F_O -Teil besteht aus einem c-Ring und verschiedenen weiteren Untereinheiten, darunter A6L als Membranspanner. Die Untereinheiten (UE) b und δ bilden eine periphere Achse, wodurch die F_1 - und F_O -Teile verbunden werden und es zu einer Rotation der Untereinheiten α , β und a kommt. Die UE A6L (auch Untereinheit 8) ist die durch das *Atp8-Gen* betroffene Untereinheit. Sie wird in einer einzelnen Kopie präsentiert (Stock et al 2000). Für Hefepilze konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der UE 8 bedingt, dass die UE 6 nicht in den Enzymkomplex integriert wird, so dass ein funktionsloses Enzym resultiert (Hadikusumo et al 1988). Die Bedeutung liegt vermutlich in der Bildung eines stabilisierenden peripheren Stiels (Bateson et al 1999). Bei dem Protonentransport aus dem Intermembranraum in den Matrixraum kommt es zunächst zu einer Bindung der Protonen an zwei c-UE und beim Verlassen des Protonenkanals zu einer Rotation der c-Untereinheiten. Durch die Verbindung der beiden ATPase Einheiten F_1 und F_O kommt es somit ebenfalls zu einer Rotation der α - und β -Untereinheiten. Hierdurch wird aufgrund der Konformationsänderungen der β -Untereinheiten ATP aus ADP + P_i gebildet und gelangt in den Matrixraum (Junge et al 1997; Zhang et al 2013). Für den Transport des ATP aus dem Matrixraum in das Zytosol ist ein Austausch mit zytosolischem ADP erforderlich. Dieser Transport wird über Adeninnukleotidtranslokasen ermöglicht (Wallace 2010).

Die Untereinheiten a und A6L sind vom *mt-Atp6* und *mt-Atp8-Gen* kodiert. Das *mt-Atp8-Gen*, was für eine Untereinheit der F_O -Domäne codiert (Zhao et al 2011), wird zusammen mit dem Gen der ersten Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (COX1) cotranskribiert und seine Translation durch die F_1 -Domäne reguliert, wobei dessen katalytische Aktivität dabei unbedeutend ist. In Studien, die eine Translationsminderung des *mt-Atp8-Gens* durch die F_1 -Domäne zeigten, wurde die COX1 inhibiert, was auf den Defekt der ATP-Synthase durch Mutationen in den Untereinheiten wie des *mt-Atp8-Gen* zurückgeführt wurde (Rak and Tzagoloff 2009). Hieraus lässt sich vermuten, dass Mutationen, insbesondere im *mt-Atp8-Gen*, zu Störungen der ATP-Synthase-Funktion und damit zu Krankheiten führen können. Unter anderem für eine Kardiomyopathie ist diese Auswirkung bereits nachgewiesen worden (Jonckheere et al 2009; Jonckheere et al 2011).

1.2.3 Mitochondriales Genom

Die meisten mitochondrialen Proteine sind nukleär codiert (nDNA) und werden nach der zytosolischen Synthese ins Mitochondrium transportiert (Nicholls et al 2013). Mitochondrien besitzen zu dem ein eigenes kleines Genom. Beim Menschen zeigt sich dieses mitochondriale Genom (mtDNA) als einzelnes zirkuläres Doppelstrang-Chromosom mit einer Größe von 16,571 kb, das für insgesamt 37 Gene kodiert (Lavrov 2007). Neben den 13 Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe kodieren diese Gene für 22 tRNA und 2 rRNA. Mit ihrer Aufgabe für mitochondriale Proteine zu kodieren, erfüllen die Gene die funktionelle Aufgaben der Instandhaltung der mtDNA, mitochondrialer Proteinsynthese und Proteinolyse, des Proteinimports, mitochondrialer Replikation, Eisen-Schwefel-Cluster Synthese, des Citratzyklus sowie die Fettsäureoxidation. Zu den 13 von der mtDNA kodierten Untereinheiten der Atmungskette gehören die 7 Untereinheiten des Komplex I (ND1-4, 4L, 5 und 6), eine Untereinheit des Komplex III, die drei Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase (COX I-III), sowie die beiden Untereinheiten der ATP-Synthase (ATP6 und ATP8; s. Abb. 1.3) (da Fonseca et al 2008; Dhillon and Fenech 2013).

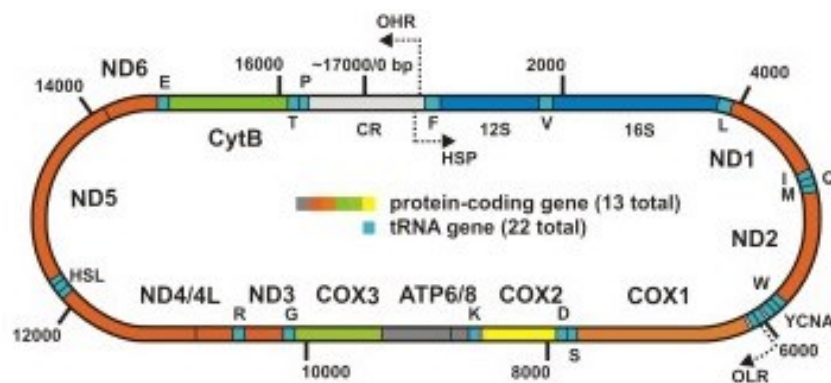


Abb. 1.3 Mitochondriales Genom

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Gene innerhalb des mitochondrialen Genoms (~17.000 bp). Abkürzungen: HSP, putative heavy-strand promoter; OHR, origin of heavy-strand replication; OLR, origin of light-strand replication (da Fonseca et al 2008).

1.2.4 Mitochondriopathien

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle und sind somit essentiell für das Überleben eukaryoter Lebewesen. Neben ihrer Funktion im aeroben Stoffwechsel durch die Atmungskette ATP zu generieren, sind sie an katabolen Prozessen und an der Bildung wichtiger Proteine beteiligt. Eine Störung mitochondrialer Proteine, sei es durch Mutationen mitochondrialer oder nukleärer DNA, führt somit zu einer Fehlfunktion und damit zu möglichen Erkrankungen. Mitochondrien zeigen eine ausgeprägte Dynamik, mit der sie durch Fusion und Fission u.a. erworbene mitochondriale Dysfunktionen zu kompensieren versuchen und sich an jeweilige Energieanforderungen adaptieren (van der Blik et al 2013). Mitochondriale Dysfunktionen sind bekannte Ursachen für degenerative Erkrankungen, das Altern und Krebsentstehung. Häufig sind bei Erkrankungen isolierte Defizite beteiligt, die einen der mitochondrialen Komplexe, entweder durch einen Defekt einer spezifischen Untereinheit der Atmungskette oder durch Mutation eines für diesen Komplex wesentlichen Faktor, betreffen (Nicholls et al 2013). Da Mitochondrien für viele metabolische Prozesse essentiell sind, ist ein OXPHOS-Defizit schädigend für die jeweilige Zellphysiologie (Smeitink et al 2006). Im Einzelnen handelt es sich dabei um folgende fünf Veränderungen:

1. Der zelluläre pH-Wert wird durch eine Verschiebung des Pyruvat-Laktat-Verhältnisses verändert. Durch eine Störung des OXPHOS-Systems wird Pyruvat weniger in den Citratzyklus geschleust und metabolisiert, stattdessen verstärkt zu Laktat metabolisiert.
2. Eine Störung des Potentials der Inneren Mitochondrienmembran bedingt eine Störung der Transportkapazität. Das führt zu einer Imbalance der jeweiligen Metabolite.
3. Eine erhöhte Oxidation auf Seite der Elektronen transferierenden Substanzen und erhöhte Reduktion auf Seite der Elektronentransportkette führen zu einer Verschiebung des Reduktions-/Oxidationsverhältnisses.
4. Der Anstieg von ROS bedingt einen Zellschaden und stört den Signalweg der Zelle.
5. Es kommt zu einer Fehlsteuerung apoptotischer Signalwege, die auch in den Mitochondrien stattfinden. (Nicholls et al 2013)

Eine Störung des OXPHOS-Systems wird mit einem T2DM und einer Insulinresistenz, die aus einem gestörten Glucosemetabolismus resultiert, assoziiert (Maassen et al 2004).

Viele Erkrankungen bzw. Mutationen sind durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bedingt. ROS werden hauptsächlich durch die Atmungskettenkomplexe I und III gebildet und

physiologisch durch die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase neutralisiert (Smeitink et al 2006). Eine gesteigerte ROS-Produktion aufgrund einer inhibierten Atmungskette führt zu einem Zellschaden und einer Dysfunktion (Balaban et al 2005). Eine Störung der Komplexe IV und V führen indirekt zur Steigerung von ROS, da das durch die Störung akkumulierende reduzierte Ubichinon ein starker Induktor der ROS-Produktion durch den Komplex I ist (Smeitink et al 2006). Diese freien Radikale, die in den Mitochondrien gebildet werden, zerstören Makromoleküle wie Proteine, Lipide, mtDNA und führen bei ihrer Akkumulation zu einer Zellalterung. Hauptsächlich sind Deletionen und Punktmutationen der mtDNA für Dysfunktionen von Bedeutung. Diese Dysfunktionen gehen mit einer Beeinflussung des OXPHOS-Systems einher und akkumulieren in postmitotischen Zellen wie Hirnzellen, Herz- und Skelettmuskelzellen und Zellen des Endokrinums (Yang et al 2013).

Eine bedeutende Mutation ist die Adenin zu Guanin Transition an Position 3243 der mitochondrialen tRNA^{Leu(UUR)}. Diese wurde bei Patienten mit maternal einhergehendem Diabetes (1 – 2 % aller Diabeteserkrankungen) und Schwerhörigkeit identifiziert, aber auch in Patienten mit mitochondrialer Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfall ähnlichen Episoden, chronisch progressiver Ophthalmoplegie, Kardiomyopathie und progressiver Nierenerkrankung (van den Ouweland et al 1999).

Mehr als 200 Mutationen der mtDNA sind mit neurodegenerativen und muskulären Erkrankungen assoziiert. Eine der am besten untersuchten ist die A8344G MERRF (myoklonische Epilepsie mit „ragged-red fibres“) Mutation des mt-tRNA^{Lys} Gens, die auf dem T-Arm lokalisiert ist. Diese Mutation führt zu einer herabgesetzten Aktivität der Atmungskettenkomplexe I und IV, geringerer oxidativen Phosphorylierung und herabgesetztem Potential der inneren Mitochondrienmembran (Kolesnikova et al 2004).

Eine weitere Mitochondriopathie stellt die ‚mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie‘ (MNGIE) dar. Sie ist assoziiert mit einer Depletion, multiplen Deletionen und Punktmutationen der mtDNA bedingt durch eine Mutation der Thymidin-Phosphorylase. Hierbei exponiert ein Defekt der Cytochrom-c-Oxidase und der Atmungskettenkomplexe I, III und IV (Hirano et al 2005).

Generell ist die Inzidenz der Mitochondriopathien in den letzten Jahren gestiegen und zum Teil konnte die Existenz klinischer Symptome auf eine mtDNA-Mutation zurückgeführt und ein entsprechendes Gen identifiziert werden (Nicholls et al 2013).

Folgende Tabelle zeigt überschaubar einige Mitochondriopathien:

Mitochondriopathie	Involviertes Gen	Klinik
Hereditäre Leber'sche Optikusneuropathie (LHON)	mtND6-Gen (Untereinheit der NADH-Dehydrogenase)	Blindheit im zweiten Lebensjahrzehnt
Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO)	mt-tRNA ^{Val} T1658C	Neuromuskuläre Symptomatik
Myoklonische Epilepsie mit ‚ragged-red fibres‘ (MERRF)	mt-tRNA ^{Lys} -Gen	Muskelschwäche, Myoklonien, zerebrale Krampfanfälle
Mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose (MELAS)	mt-tRNA ^{Leu(UUR)} -Gen	Kortikale Blindheit, Hemiparese, Hemianopsie, episodisches Erbrechen, Muskelschwäche, Demenz, Kleinwuchs, Laktatazidose
Friedreich-Ataxie	Frataxin-Gen (kernkodiert)	Spinozerebelläre Heredoataxie in der späteren Kindheit
Autosomal dominante optische Atrophie Typ I (DOA)	OPA1-Gen (kernkodiert)	Blindheit im zweiten Lebensjahrzehnt
Leigh-Syndrom	mt-Atp6-Gen (Austausch von Thymin gegen Guanin)	Neuromuskuläre Symptomatik, Ataxie, Retinitis pigmentosa

**Tab. 1.2 Erkrankungen auf dem Boden einer Mitochondriopathie / mitochondrialen Dysfunktion
(modifiziert nach Larsson and Luft 1999; Wallace 1999)**

1.3 Insulin und Leptin

1.3.1 Extra- und intrapankreatische Einflussfaktoren auf die Insulinsynthese und Insulinsekretion

Das Pankreas ist eine gemischt exokrin-endokrine Drüse. Ihr endokriner Anteil mit den Langerhans'schen Inseln macht nur 2 % aus und sezerniert Hormone ins Blut (O'Dowd and Stocker 2013). Innerhalb der Inseln des endokrinen Pankreas differenzieren sich Zelltypen mit spezifischen Hormonen (Bonner-Weir and Orci 1982), darunter die β -Zellen, die für die Insulinproduktion verantwortlich sind (O'Dowd and Stocker 2013).

Der Metabolismus innerhalb der Langerhans'schen Inseln und der Stoffwechsel der Glucose in den β -Zellen umfasst verschiedene Zyklen, die für die suffiziente Insulinsekretion Voraussetzung sind (s. Abb. 1.4). Über Glucosetransporter (GLUT 2) gelangt Glucose in die β -Zellen. Dort wird es über die Glycolyse zu Pyruvat abgebaut. Das Pyruvat ist ein Substrat, das durch mitochondriale Pyruvat-Kanäle ins Mitochondrium gelangt. Dort wird es vor allem über die Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgebaut. Das Acetyl-CoA gilt als Initialmetabolit des Citratcyclus. (Sugden and Holness 2006; Sugden and Holness 2011). Der weitere Abbau des Acetyl-CoA führt zur Bildung der Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$, die für die oxidative Phosphorylierung und somit für die ATP-Synthese essentiell sind. Glycolyse, Oxidative Phosphorylierung und ATP-Synthese sind Voraussetzung für eine Glucose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS).

Die Insulinsekretion ist wie folgt beeinflusst. Die über GLUT 2 (Mueckler and Thorens 2013) aufgenommene Glucose wird per Glycolyse abgebaut und in den Citrat-Zyklus eingeschleust, was zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses führt. Das ATP führt zu einer Hemmung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle). Die resultierende Depolarisation der Plasmamembran führt zu einem Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca^{2+} -Kanäle). Über das Kalzium und sogenannte SNARE-Proteine fusionieren die Insulingranula mit der Plasmamembran, sodass es zu einer Insulinfreisetzung ins Blut kommt (MacDonald 2011).

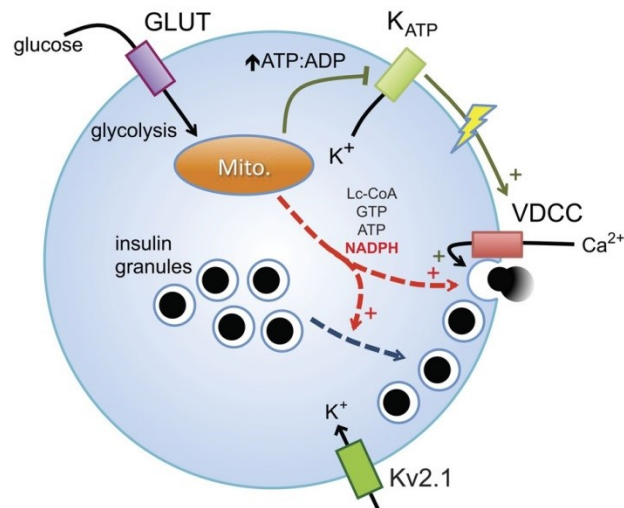


Abb. 1.4 Übersichtsmodell der Glucose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS)

Glucoseaufnahme über Glucosetransporter (GLUT) führt zu einem erhöhten intrazellulären ATP/ADP-Verhältnis. Das führt zu einer Inhibition ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K_{ATP}), wodurch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) geöffnet werden. Der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle triggert die Exozytose der Insulingranula an der Plasmamembran. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv2.1) führen über die Aufnahme von Kalium zu einer Repolarisation der Zelle, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom und die Insulinsekretion limitiert werden. Additional Outputs der Mitochondrien (Metabolite, Ionen) führen zu einem metabolisch gesteigerten Signal, das zudem die Insulinsekretion, in Form einer erleichterten Insulingranula-Rekrutierung, Andockung an die Plasmamembran sowie der Exozytose, ansteigen lässt (MacDonald 2011).

Daneben haben Fettsäuren einen sehr starken Einfluss auf die GSIS (Roduit et al 2004). Diese binden an freie Fettsäure-Rezeptoren 1, was zu einer Erhöhung der Glucose-stimulierten cytosolischen Ca^{2+} -Level und damit zu einer konsequenten Insulinsekretion führt. Chronisch erhöhte Fettsäurespiegel führen jedoch, auch in Kombination mit erhöhten Glucosespiegeln, zu einer erniedrigten Insulinproduktion, Insulinsekretion und zu einem Untergang der β -Zellen als Zeichen der Dekompensation (Kluth et al 2011; Lee et al 1994; Schulz et al 2013).

1.3.2 Der Einfluss des Adipokins Leptin auf metabolische Stoffwechselwege und seine funktionelle Rolle im Organismus

Das von den Adipozyten gebildete Leptin ist das Produkt des obesity (ob)-Gens und korreliert positiv mit der Anzahl und Masse der Adipozyten (Zhang et al 2002b). Es ist damit ein wichtiger Regulator der Nahrungsaufnahme und Energiespeicherung, der Insulinsensitivität und des metabolischen Umsatzes. Die Leptineffekte sind in erster Linie im Hypothalamus zu

finden, daneben in peripheren Organen wie dem Pankreas, dem Muskel und der Leber (Paz-Filho et al 2012). Über Leptinrezeptoren im Hypothalamus bewirkt es eine zentrale Kontrolle des metabolischen Umsatzes durch Hemmung der Ausschüttung orexigener Mediatoren (Unger 2000). Hierdurch wird die Glucoseaufnahme verringert. Peripher wird die Glucosehomöostase durch diverse Signalwege und Angriffsorte des Leptins reguliert. Durch Aktivierung einer AMP-abhängigen Kinase beeinflusst Leptin zusätzlich die Nahrungsaufnahme. Die AMP-Kinase reguliert den Energiehaushalt durch ihren Einfluss auf ATP-verbrauchende und ATP-produzierende Stoffwechselwege mit Aufnahme und Verwertung von Glucose sowie der Fettsäureoxidation (Amitani et al 2013). Daneben nimmt Leptin Einfluss auf die adipo-insuläre Achse. Es hemmt die Glucoseaufnahme über GLUT-2 (Amitani et al 2013) und wirkt als Gegenspieler zum Insulin, es steigert folglich die Lipolyse und senkt die Lipogenese (Kahn et al 2005). Studien haben gezeigt, dass das Hormon die Insulinsynthese und -sekretion senkt und somit über diese Interaktion die Glucosehomöostase positiv beeinflusst (Ceddia et al 2002). Gleichzeitig wird die Leptinproduktion durch Insulin induziert, sodass es die Insulinsensitivität durch Reduktion der Adipozytenzahl und Lipotoxizität erhöht (Paz-Filho et al 2012). Es konnte gezeigt werden, dass das von den Adipozyten gebildete Hormon auch direkten Einfluss auf die β -Zellen des Pankreas nimmt, indem es die Proliferation, Neogenese, Zellgröße und Apoptose beeinflusst (Marroqui et al 2012). In der Leber erhöht Leptin durch spezifische Enzymhemmung den Lipidtransport aus der Leber, reduziert eine Steatosis hepatis (Cohen et al 2002), senkt die hepatische Gluconeogenese und erhöht die Insulinsensitivität (Ceddia et al 2002; Paz-Filho et al 2012; Tom et al 2011).

Neben den Zytokinen TNF- α und Interleukin-6 (IL-6) gehört Leptin als Adipokin zu den proinflammatorischen Molekülen. TNF- α senkt direkt die Insulinsensitivität und steigert die Lipolyse der Adipozyten (Hotamisligil et al 1994; Zhang et al 2002a). IL-6 induziert die Lipolyse und Triglyceridproduktion und führt so zu einer Hypertriglyceridämie (Nonogaki et al 1995). Adipositas führt zu einem Anstieg inflammatorischer Moleküle und von Leptin, das eine Rekrutierung von Fettgewebsmakrophagen bedingt (Dib et al 2013). Es spielt sowohl bei der angeborenen als auch erworbenen Immunabwehr eine Rolle. Die lange Form des Leptinrezeptors, die mit der physiologischen Aktivität des Leptins assoziiert ist, wird auf den meisten Immunzellen wie den Monozyten und Makrophagen exprimiert und erhöhte Leptinlevel gehen mit erhöhter Anzahl dieser Zelltypen einher (Tartaglia et al 1995). Adipositas ist begleitet von einem andauernden erhöhten Level von zirkulierendem Leptin, was zu einer Leptinresistenz führen kann (Considine et al 1996).

Da in der vorliegenden Arbeit auch das Differentialblutbild der Mäuse analysiert wurde, ergibt sich eine mögliche Korrelation zwischen der Anzahl differenzierter Zelltypen und der Menge an Plasmaleptin. Eine gegenseitige Beeinflussung des Leptins und der mitochondrialen Atmungskette ist bisher noch nicht ausreichend geklärt, zeigt jedoch einen gewebeabhängigen Effekt. In der Leber wird die mitochondriale Aktivität gesenkt durch eine Aktivitätsminderung der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten IV und VIa der Atmungskette (Singh et al 2009). Im Muskel führt Leptin zu einer verminderten Aktivität der Atmungskettenkomplexe II, IV sowie der ATP-Synthase (Holmstrom et al 2013). Diese Ergebnisse zeigen, dass Leptin mit der Atmungskette in einem wirksamen Zusammenhang steht. Daraus ergab sich die Frage, welchen Einfluss das *mt-Atp8*-Gen in Bezug auf die Leptinkonzentration nimmt.

1.4 Steatosis hepatis und Lipidmetabolismus

1.4.1 Entstehung einer Steatosis hepatis und ihre Einflussfaktoren

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus der Kohlenhydrate, Lipide und Proteine und sorgt für eine Homöostase dieser Metabolite (Koo 2013). Eine steigende Energiezufuhr und die daraus resultierende Körperfettzunahme bedingen die Entwicklung metabolischer Störungen inklusive der Ausbildung einer Steatosis hepatis. Pathogenetisch kann die Akkumulation von Lipiden in der Leber verschiedene Ursachen haben. Dazu zählen eine gesteigerte Lipolyse der Adipozyten des viszeralen Fettgewebes, die erhöhte enterale Resorption der Nahrungsfette und die daraus resultierende Konzentrationssteigerung freier Fettsäuren (Donnelly et al 2005). Freie Fettsäuren werden an Albumin gebunden über das Blut zu den Organen transportiert und beeinflussen, gerade in der Leber und der Muskulatur, die Insulinwirkung und den Glucosemetabolismus, haben Einfluss auf die Funktion von Transkriptionsfaktoren, sind Substrate für die Lipoproteinproduktion in der Leber und regulieren die Insulinproduktion im Pankreas (Arner 2005). Eine weitere Ursache für eine hepatische Fettakkumulation ist eine mitochondriale Dysfunktion im Sinne einer beeinträchtigten Mitochondrienfunktion. Diese steht in Verbindung mit einer Insulinresistenz, wodurch die β -Oxidation der Fettsäuren beeinträchtigt wird (Fromenty et al 2004). Die Beeinträchtigung der β -Oxidation der Fettsäuren entsteht durch die verstärkte Bildung von

ROS bei der Substratoxidation. Die ROS schädigen die Mitochondrien und induzieren die Freisetzung von Lipidperoxiden, die das mitochondriale Genom schädigen, was zur verstärkten Produktion von ROS führt (Fromenty et al 2004). Auch führt die de novo Lipogenese nach Nahrungsaufnahme in der Leber zu einer Akkumulation der Lipide, da durch die Insulinwirkung die Lipolyse gehemmt und die Synthese unter anderem aus Glucose induziert wird (Postic and Girard 2008). Letztlich kann eine Verminderung der hepatischen Lipidausscheidung, die mit einer Insulinresistenz assoziiert ist, eine Steatosis hepatis fördern (s. Abb. 1.5). Die Lipidausscheidung in Form von VLDL-TG ist nicht adäquat genug, um die intrahepatische Produktion und Speicherung zu kompensieren (Fabbrini et al 2008).

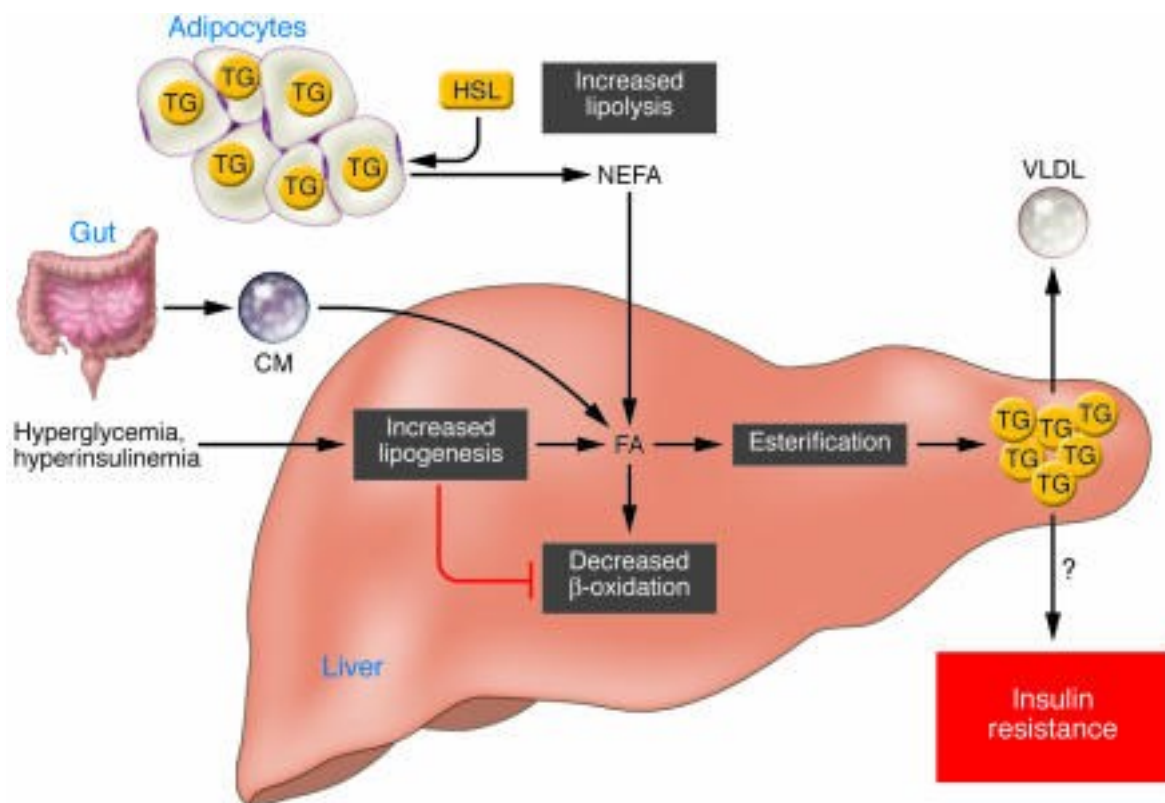


Abb. 1.5 Pathogenese der Lebersteatose

Die Abbildung zeigt eine Übersicht der Entstehung der steatosis hepatis. Nahrungslipide gelangen über Chylomikrone (CM) aus dem Darm in die Leber. Zu dem führen erhöhte Plasmaglukosespiegel (hyperglycemia) und Insulinkonzentrationen (hyperinsulinemia) zu einer gesteigerten de-novo Lipogenese (lipogenesis) und zu einer beeinträchtigten β-Oxidation, was nach Veresterung (Esterification) zu einem Anstieg intrahepatischer Lipide (TG) in Form einer Steatose führt. TG können über VLDL ans Blut abgegeben werden. Im Zustand einer Insulinresistenz kann Insulin nicht hinreichend die Hormon-sensitive Lipase (HSP) inhibieren, sodass die Lipolyse im weißen Fettgewebe nicht gehemmt wird. Die in dem Fettgewebe gespeicherten Lipide gelangen somit über das Plasma in Form von nichtveresterten Fettsäuren (NEFA) in die Leber (Postic and Girard 2008).

1.4.2 Lipolyse und Blutlipidparameter

Unter Nahrungsaufnahme spielt das Insulin eine wesentliche Rolle im Lipidmetabolismus. Insulin bindet an spezifische Rezeptoren der Adipozyten, wodurch es zu einer Tyrosin Phosphorylierung und damit zu einer Aktivierung des Insulinrezeptors kommt. Daraus resultiert eine Interaktion mit ‚Insulin receptor substrates‘ (IRS-1 und IRS-2). Durch die weitere Signalkaskade wird die Hormon-sensitive Lipase (HSL) weniger aktiviert (Bjornholm et al 2002; Degerman et al 2001). Insulin hemmt somit die Lipolyse und induziert gleichzeitig die de novo Lipogenese. Bei einer bestehenden Insulinresistenz durch Adipositas ist die Lipolyse folglich gesteigert und der Anteil freier Fettsäuren erhöht (Delarue and Magnan 2007). Normalerweise stammen im Plasma transportierte freie Fettsäuren aus in der Nahrung vorhandenen Lipiden oder werden über die Lipolyse der Adipozyten gebildet. Adipozyten bestehen zu > 95 % aus Triglyceriden, die während der Lipolyse zu Glycerol und freien Fettsäuren hydrolysiert werden. Das viszerale Fett steht über die Portalvene in direkter Verbindung zur Leber und hat somit direkten Einfluss auf die Leberfette. Erhöhte Konzentrationen hepatischer Lipide führen zur Bildung der von den Lipiden abgeleiteten ‚second messenger‘ wie Diacylglycerol und Ceramide, die sich negativ auf die Insulinresistenz auswirken (Jornayvaz and Shulman 2012). Durch die erhöhte Insulinresistenz vermindert sich der antilipolytische Effekt vom Insulin, so dass die Lipolyse gesteigert ist. Die Lipolyse ist folglich gesteigert bei Adipositas, die mit einer Insulinresistenz einhergeht, und hat so eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Dyslipidämien, Hyperinsulinämie und Glucoseintoleranz. Bei bestehender Adipositas können erhöhte Blutlipide gemessen werden, die u.a. durch verstärkten hepatischen Export entstehen. Daneben spielt die Lipolyse, getriggert durch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) im Fettgewebe eine Rolle. Dieses Zytokin induziert die Lipolyse über eine MAP-Kinase. Der Prozess wird unter anderem bei Nahrungskarenz, insbesondere bei bestehender Adipositas, über β -adrenerge Rezeptoragonisten wie Catecholamine induziert (Arner 2005). Unter anderem wird er auch durch eine Proteinkinase A abhängige Phosphorylierung und Aktivierung der HSL reguliert.

1.5 Adaptation der hämatopoietischen Zellen an das Nahrungsangebot

Blutzellen werden physiologisch in zwei Gruppen, die Erythrozyten (rote Blutzellen) und Leukozyten (weiße Blutzellen), unterteilt. Ihre Regulation und Adaptation soll im Folgenden kurz dargestellt werden:

Die Erythropoiese (Entwicklung der roten Blutzellen) erfolgt kontinuierlich aus pluripotenten Stammzellen (Lodish et al 2010). Dabei beginnt die Synthese in der fetalen Leber und wechselt mit zunehmender Entwicklung und Alter ins Knochenmark (Palis et al 1999). Wesentliches Signalthormon für die Zelldifferenzierung ist das Erythropoietin, ein in der Niere gebildetes Hormon (Lodish et al 2010), welches insbesondere unter hypoxischen Bedingungen ausgeschüttet wird. Die differenzierten Erythrozyten enthalten weder einen Zellkern noch Mitochondrien. Dadurch erhalten sie einen stabilen oxydativen Status, limitieren die ROS-Produktion und adaptieren sich besser an Umstände, unter denen es zu einem Anstieg der metabolischen Rate mit Zunahme der ROS-Synthese kommt (Zhang et al 2011). Somit können sie ihre Funktion im Sauerstofftransport aufrechterhalten. Gleichzeitig sind sie aber auch vulnerabler für oxidative Schäden.

Die Myelopoiese und Lymphopoiese (Entwicklung der weißen Blutzellen: Granulozyten und Lymphozyten) erfolgt aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (Mora-Garcia et al 2003). Ihre Differenzierung zu den Subpopulationen der Leukozyten und Lymphozyten wird durch verschiedene Hormone sowie Zytokine getriggert (Bender et al 1987). Weiße Blutzellen enthalten einen Zellkern und Mitochondrien. Diese benötigen sie für die Energiegewinnung und Adaptation an ihre entsprechenden Aufgaben im Stoffwechsel, insbesondere der Inflammation, bei Infektionen und Phagozytose (Kong et al 2001). Dadurch haben sie einen variablen oxydativen Status, produzieren ROS und sind entsprechend sensibel für Zellschäden in Zuständen erhöhter ROS-Produktion (Kong et al 2001).

Blutzellen sind sehr sensibel für eine Lipoinflammation, sodass Lipide oder das Adipozytäre Leptin und andere Adipokine zu einer veränderten Zellassemblierung unter metabolischer Belastung wie einer HFD führen (Trottier et al 2012). Es ist bekannt, dass von den Adipozyten, als endokrines Organ, Adipokine wie Leptin, Adiponektin und Resistin gebildet werden, wodurch die Energiezufuhr, die Metabolisierung und Speicherung der Nährstoffe gesteuert werden (Qatanani and Lazar 2007). Insbesondere Leptin induziert die Granulopoiese und führt zu einem Anstieg der Lymphozytenzahl (Trottier et al 2012).

Untersuchungen haben gezeigt, dass bei schlanken Individuen eine andere Zellassemblierung weißer Blutzellen besteht als bei Übergewichtigen. Mit steigender Adipozytenzahl kommt es zu einer Erhöhung der Makrophagenzahl durch Rekrutierung über proinflammatorische

Zytokine wie TNF- α und NO-Synthase 2 (Lumeng et al 2007; Odegaard et al 2007). Während unter Normalgewicht IL-4 produzierende Eosinophile vorherrschen, zeigt sich bei Übergewicht ein Vorherrschen an Neutrophilen, Mastzellen sowie B-Lymphozyten (Liu et al 2009; Talukdar et al 2012). Daraus lässt sich ableiten, dass entsprechende Leukozyten je nach Ernährungszustand spezifische Funktionen haben. Unter normokalorischen Bedingungen aktivieren Zytokin-produzierende Eosinophile und T_{reg}-Zellen sogenannte M2-Makrophagen. Die M2-Makrophagen produzieren u.a. IL-10, das die Insulinsensitivität fördert. Unter hyperkalorischen Bedingungen werden M1-Makrophagen durch adipozytäre Zytokine und Mediatoren der proinflammatorischen Leukozyten aktiviert. Die M1-Makrophagen produzieren IL-1 β , IL-6 und TNF- α , wodurch die Insulinsensitivität gesenkt und eine Insulinresistenz gefördert wird (Carvalho et al 2013; Odegaard and Chawla 2013). Ein Anstieg von ROS führt auch zum Freisetzen proinflammatorischer Zytokine. Diese aktivieren Leukozyten, sodass proinflammatorische Leukozyten aktiviert werden (Barbieri and Sestili 2012; Langen et al 2002; Li et al 1999).

Liegt keine erhöhte Adipozytenzahl vor, zeigt sich unter alternativen Makrophagen, T_{reg}-Zellen, Eosinophilen und den natürlichen Killerzellen eine synergistische Funktion zur Erhaltung der Insulinsensitivität und der tolerablen Immunologie (Feuerer et al 2009; Kang et al 2008; Odegaard et al 2008). Eine Reduktion einer dieser Zelllinien stört das protektive Zusammenwirken und destabilisiert das antiinflammatorische System, was sich negativ auf die Insulinwirkung auswirkt. Die durch steigende Adipozytenzahl entstehende Neuassemblierung der Leukozyten fördert das proinflammatorische System und damit die Insulinresistenz (Nishimura et al 2009; Patsouris et al 2008).

Für die Erythrozyten konnte gezeigt werden, dass bei steigender Adipozytenzahl und resultierender Insulinresistenz bzw. metabolischem Syndrom die roten Blutzellen in ihrer Anzahl zunehmen und sich morphologisch verändern. So kommt es bei einem Diabetes mellitus Typ 2 zu einem Anstieg der Erythrozytenzahl, die eine höhere Affinität zum Sauerstoff zeigen. Der Hämatokrit korreliert dabei positiv mit dem HbA_{1C} (Graham et al 1980; Hanley et al 2009; Simmons 2010).

1.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, die Auswirkung der *mt-Atp8*-Mutation in einem Mausmodell zu untersuchen. Das *mt-Atp8*-Gen codiert für eine Untereinheit des F_O-Teils der mitochondrialen ATP-Synthase der Atmungskette. Bei der Mutation handelt es sich um einen Polymorphismus, bei dem es durch einen Nukleotidaustausch von Guanin zu Thymin zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Tyrosin innerhalb des *mt-Atp8*-Gens kommt. Untersucht wurden verschiedene metabolische Prozesse und die Auswirkung der Mutation auf zellulärer Ebene. Für die Betrachtungen galt der Vergleich im Hinblick auf Alter, Geschlecht und Fütterung (HFD vs. CD) zwischen dem veränderten Stamm (B6-*mt*^{FVB}) und dem Kontrollstamm (B6-*mt*^{AKR}), der sich nur im *mt-Atp8*-Gen von den B6-*mt*^{FVB} Tieren unterscheidet. Im Einzelnen handelt es sich dabei um folgende Untersuchungen:

1. Welchen Einfluss hat das *mt-Atp8*-Gen auf die Gewichtsentwicklung der Tiere unter HFD und CD über einem Zeitraum von sechs Monaten? Wie unterscheiden sich die Genvarianten in ihrem Einfluss auf die Gewichtsentwicklung unter einer metabolischen Belastung (HFD)?
2. Welche Auswirkung hat die *mt-Atp8*-Mutation auf den Glucosemetabolismus? Wie adaptieren sich die Blutglucose und Insulinspiegel unter erhöhtem metabolischem Stress im Verlauf der Hochfettdiät?
3. Welche adaptiven Veränderungen der pankreatischen β -Zellen im Hinblick auf die β -Zellmasse ergeben sich bei den beiden Mausstämmen unter der jeweiligen Diät? Verändern sich die Anzahl sowie die Größe der Pankreasinseln? Ist diese Veränderung abhängig vom jeweiligen mitochondrialen Genotyp?
4. Wie wirkt sich eine Hochfettdiät oder eine Kontrolldiät auf den Lipidstoffwechsel aus? Wie verändern sich unter entsprechender Diät die Blutlipidparameter Cholesterin und Triglyceride? Kommt es auch zu einer veränderten Fettakkumulation in der Leber? Welchen Einfluss besitzt hier die *mt-Atp8*-Mutation?
5. Wie verändert sich das Differenzialblutbild der Tiere unter einer Hochfettdiät oder einer Kontrolldiät im Sinne eines chronischen Inflammationsstatus? Welchen Einfluss nimmt die *mt-Atp8*-Mutation auf diese Veränderungen?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Material	Bezugsquelle
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma, München
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, München
Albumin bovine Fraction V pH 7	Serva, Heidelberg
Anti-Meerschweinchen IgG	Dianova, Hamburg
Aqua destillata	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Rostock
Ethanol (unvergällt)	Sigma, München
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma, München
H ₂ O ₂	Sigma, München
HCl (4 %, 10 %)	Sigma, München
Ketamin (10 %)	Essex, München
Meerschweinchen-anti-Insulin-Antikörper	Dako, Hamburg
Maus Insulin ELISA Kit	Mercodia, Uppsala, Schweden
Maus Leptin ELISA Kit	Millipore, Missouri, USA
N ₂ (flüssig)	Air Liquide, Güstrow
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Sigma, München
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphoenolpyruvat	Roche, Mannheim
Polyoxyethylen-10-tridecylether	Sigma, München
Pyruvatkinase	Sigma, München
Randox [®] Triglycerides Assay TR210	Randox, Krefeld
QuantiPro [™] BCA Assay Kit	Sigma, München
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München

Geräte und Verbrauchsmaterialien**Bezugsquelle**

ADVIA® 2120 (Blutanalysegerät)	Siemens, Eschborn
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Glucometer Free Style Mini	Abbott, Wiesbaden
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Kurzkapillaren (EDTA-beschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht
Laborwaage Laboratory LC 620 S	Sartorius, Göttingen
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotom	Leica, Wetzlar
Omnican 100 Spritzen	Braun, Melsungen
Omnifix F Spritzen	Braun, Melsungen
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pinzette anatomisch	Aesculap, Tuttlingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Präparierschere	Aesculap, Tuttlingen
Reflotron	Roche, Grenzach-Wyhlen
Skalpell	Aesculap, Tuttlingen
Spezialfutter	Altromin, Lage
CD (Kontrolldiät, 10 % kcal aus Fett)	
HFD (Hochfettdiät, 60 % kcal aus Fett)	
Stereomikroskop	Zeiss, Göttingen
Sterican Kanülen Gr. 18	Braun, Melsungen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultramikrotom Ultracut SWS	Leica, Wetzlar
Ultra-Turrax (Homogenisator)	IKA, Staufen
VICTOR™ plate reader (Photometer)	PerkinElmer, Rodgau
Wasserbad	GLF, Burgwedel
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.2 Tiere und Tierhaltung

Untersucht wurden die conplastischen Mausstämme C57BL/6J-mt^{AKR/J} (B6-mt^{AKR}) und C57BL/6J-mt^{FVB/N} (B6-mt^{FVB}), die sich von den Ausgangsstämmen nur an einer Stelle im mitochondrialen Genom, der *ATPase8-Untereinheit* (*mt-Atp8*), unterscheiden.

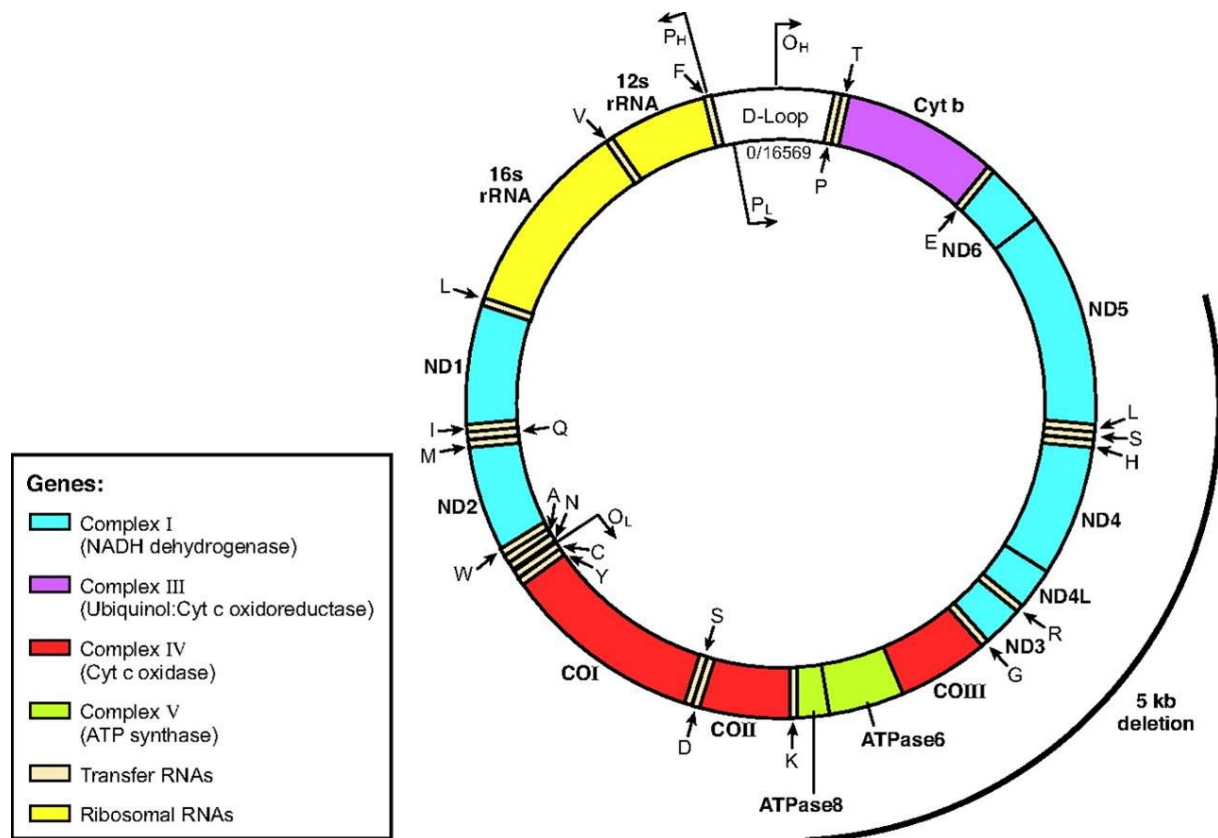


Abb. 2.1 Mitochondriales Genom

Das mitochondriale Genom codiert für 37 Gene (13 Polypeptide, 22 tRNAs und 2 rRNAs). Jedes Mitochondrium enthält Kopien der zirkulären Doppelstrang-DNA. Humane mtDNA codiert für 7 der 43 Untereinheiten des Komplex I (NADH-Dehydrogenase), 1 der 11 Untereinheiten des Komplex III (Ubichinon: Cytochrom-c-Oxidoreduktase), 3 der 13 Untereinheiten des Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) und 2 der 16 Untereinheiten des Komplex V (ATP-Synthase) (Madamanchi and Runge 2007).

Für die Erzeugung der conplastischen Mausstämme wurden die Weibchen des mitochondrialen Donorstammes (AKR & FVB) mit den Männchen des gewählten Hintergrundstammes (B6) verpaart. Das maternal vererbte mitochondriale Genom konnte so übertragen werden. Es folgte eine Rückkreuzung über 10 Generationen, bei der die

weiblichen Nachkommen mit Männchen des Empfängerstammes (B6) gepaart wurden. Diese Nachkommen wurden nunmehr als rein angesehen, sodass sie für die Untersuchung genutzt werden konnten.

Das mitochondriale Genom des Stammes B6-mt^{AKR} unterscheidet sich von dem des Stammes B6-mt^{FVB} im mitochondrialen (*mt*)-*Atp8*-Gen. Dabei besteht bei dem B6-mt^{FVB} Stamm ein natürlicher nt7778T Polymorphismus innerhalb des *mt-Atp8*-Gens. Dieser führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Tyrosin innerhalb des hydrophoben ATP-Synthase-Protein 8 (*Atp8*).

Alle Tiere entstammen der Zentralen Tierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Sie erhielten ein kommerzielles, pelletiertes Alleinfuttermittel (Altromin) und Wasser ad libitum. Die Raumtemperatur betrug 20 ± 2 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 ± 5 %. Der Hell-Dunkel-Zyklus betrug 12 Stunden und die Tiere waren frei von Viren und anderen Krankheitserregern (gemäß FELASA-Richtlinien).

Alle Tierversuche wurden vom ‚Landesamt für Lebensmittelsicherheit, Landwirtschaft und Fischerei‘ Rostock genehmigt (Antragsnummer: LALLF-MV 7221.3-1.1-061/10)

2.3 Lipidbelastungsstudie

Um zu untersuchen, ob und in welcher Intensität eine Lipotoxizität die Funktion u.a. der pankreatischen β -Zellen von normoglykämischen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} beeinflusst, erhielten die Tiere über drei und sechs Monate eine fettreiche Diät (HFD 60 % kcal aus Fett) oder eine fettarme Kontrolldiät (CD 10 % kcal aus Fett). Die Lipidbelastungsstudie begann in der 4. Lebenswoche nach dem Absetzen der Tiere und endete mit dem Absetzen der Diät, entsprechend der zwei Zeitpunkte nach drei bzw. sechs Monaten. Die Tiere wurden getrennt nach Stamm und Geschlecht gehalten und erhielten in Gruppen aus 4-5 Tieren entweder die HFD oder CD. Dabei hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser.

Am Ende der Lipidbelastungsstudie wurden nach Narkotisierung und Tötung der Tiere Blutproben aller Tiere entnommen und nach Zentrifugation für die Bestimmung der Seruminsulinspiegel genutzt. Ebenso wurden von allen Tieren die Blutlipidparameter Triglyceride und Cholesterin, aber auch die Höhe der Leptinkonzentration bestimmt. Es wurde der Blutzucker gemessen, sowie vollständige Blutbilder erstellt. Einer Kohorte (n = 6 - 9) wurden die Leber für die hepatische Triglyceridbestimmung, einer weiteren

Kohorte das Pankreas zur Immunfluoreszenz basierten Größenbestimmung der Inselnflächen und Quantifizierung der β -Zellmasse entnommen.

Für die Entnahme der Organe wurden die Tiere zu Beginn mit einer Äthernarkose betäubt. Es folgte die retrobulbäre Blutentnahme mittels EDTA-beschichteter Kurzkapillare von ca. 1 - 1,5 ml Blut. Anschließend erfolgte die Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation. Das Abdomen wurde nun kaudomedial mittels Scherenschnitt durch Haut und Muskulatur eröffnet und beidseits der Medianen der Schnitt nach lateral erweitert. Die entstandenen Lappen wurden nach laterokraniel verlagert und mit Kanülen auf der Arbeitsfläche fixiert. Sofort wurde das Pankreas vollständig herauspräpariert und für weitere Untersuchungen jeweils zur Hälfte in Formalin (4 % Paraformaldehyd) und flüssigem Stickstoff fixiert.

2.3.1 Blutentnahme aus der Schwanzvene und Blutglucosebestimmung

Zur Verlaufskontrolle der Blutglucose wurde während der Studie die Schwanzspitze der Tiere eingeritzt und eine kleine Menge Blut, ca. 0,3 μ l, entnommen. Der Blutglucosespiegel wurde mit dem Glucosemessgerät „Free Style Mini“ nach der Glucoseoxidase-Methode bestimmt.

Für die Untersuchung der Blutglucosespiegel innerhalb der Lipidbelastungsstudie wurden die Messungen alle 2 Wochen durchgeführt. In Hinblick auf die Stoffwechsellage galten Blutglucosewerte unter 9,0 mmol/l als normoglykäm.

2.3.2 Retrobulbäre Blutentnahme

Die Tiere wurden mit einer Äthernarkose narkotisiert. Mit einer EDTA-beschichteten Kurzkapillare erfolgte anschließend die retrobulbäre Entblutung.

2.3.3 Bestimmung des Körpergewichtes

Das Körpergewicht der Tiere für die Lipidbelastungsstudie wurde alle zwei Wochen mit einer Laborwaage bestimmt und genau dokumentiert.

2.4 Bestimmung des Insulingehaltes im Serum

Für die Bestimmung des Seruminsulingehaltes wurden den B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tieren unter HFD als auch unter CD nach drei und sechs Monaten Fütterungsdauer 50 µl Blut entnommen und anschließend zentrifugiert. Durch diesen Prozess wurden die korpuskulären Bestandteile des Blutes vom Serum getrennt. Das Serum wurde für die Messung verwendet.

Die Ermittlung des Insulingehaltes erfolgte mit dem Maus Insulin-ELISA Kit (Mercodia, Uppsala, Schweden). Es ist ein Flüssigphasen zwei-Seiten Enzym Immunoassay und basiert auf der Sandwichtechnik, in der zwei monoklonale Antikörper an separate Antigendeterminanten des Insulinmoleküls binden. Während der Inkubation reagiert das Insulin mit Peroxidase-konjugierten Anti-Insulin Antikörpern, die an den Mikrotitervertiefungen (well) gebunden sind. Ein anschließendes Auswaschen der Platten entfernt die ungebundenen Enzym-markierten Antikörper. Das gebundene Konjugat wird mit 3,3', 5,5'-Tetramethylbencidin (TMB) detektiert. Die Reaktion stoppt durch Säurezugabe, wodurch ein kalorimetrischer Endpunkt erzeugt wird. Es erfolgt eine photospektrometrische Messung bei einem 450 nm Filter im Mikrotiterplatten Photometer. Durch Übertragen der Messergebnisse der Proben auf eine zuvor durch die fixen Konzentrationen der Kalibratoren erstellten Eichreihe ergeben sich die jeweiligen Insulinkonzentrationen der unbekannten Proben.

Lösungen und Medien

Beschichtete Platte (monoklonal Maus anti-Insulin)	96 well	
Kalibratoren 1, 2, 3, 4, 5 (rekombinantes Humaninsulin: 0,115; 0,136; 0,248; 0,703; 2,877 µg/l) Gelb farbmarkiert	1000 µl	
Kalibrator 0 (rekombinantes Humaninsulin: 0,099 µg/l) Gelb farbmarkiert	5 ml	
Enzymkonjugat (Peroxidase konjugiertes monoklonales Maus anti-Insulin)	1,2 ml	
Enzym Konjugatpuffer Blau markiert	12 ml	
Waschpuffer	50 ml	in 1000 ml Aqua dest. lösen für den 1x Waschpuffer
Substrat TMB farblos	22 ml	
Stopp-Lösung 0,5 M H ₂ SO ₄	7 ml	

2.4.1 Proben und Ablauf

Alle Reagenzien und Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht. Proben >200 mU/L Insulin sollten 1+9 mit Kalibrator 0 gelöst werden. Pro Probe und Standard wurden je drei wells (Triplets) verwendet. Der Testvorgang beinhaltete im Einzelnen folgende Schritte:

Nach Herstellung der Enzymkonjugatlösung (1x) und des Waschpuffers wurden in die jeweiligen Vertiefungen der Titerplatten jeweils 25 μ l der Kalibratoren und der Proben pipettiert. Nach Addition von 100 μ l Enzympuffer erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) auf einem Plattenschüttler (700 - 900 rpm) für eine Stunde. Das Waschen der Platten (5 Vorgänge) erfolgte nach Entfernung der flüssigen Medien mit 350 μ l Waschpuffer je Kavität und Entfernen über einem Saugpapier. Pro Kavität wurden 200 μ l Substrat TMB hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l Stopplösung und kurzem (5 s) Schütteln auf dem Plattenschüttler, erfolgte die Messung des Insulingehaltes bei einem 450 nm Filter am ‚VICTOR™ Mikrotiterplatten Photometer‘ (Perkin Elmer, Rodgau).

2.5 Bestimmung des Leptingehaltes im Serum

Für die Bestimmung des Serumleptingehaltes wurde den B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tieren unter fettreicher und unter fettarmer Diät nach drei und sechs Monaten Fütterungsdauer 50 μ l Blut entnommen und anschließend zentrifugiert. Durch diesen Prozess wurden die korpuskulären Bestandteile des Blutes vom Serum getrennt. Das Serum wurde für die Messung verwendet.

Die Ermittlung des Leptingehaltes erfolgte mit dem Maus Leptin-ELISA-Kit (Millipore, Missouri, USA). Das Prinzip basiert auf der Sandwichtechnik, bei der es zunächst zu einer Bindung des Leptins der Proben durch ein in die Mikrotiterplatten vortitriertes Antiserum und dadurch zu einer Immobilisierung der entstandenen Komplexe in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten kommt. Nach dem Waschen kann ein gereinigter biotinylierter Antikörper an den Leptinkomplex binden. Nach Addition von Meerrettichperoxidase folgt eine Quantifizierung der immobilisierten Antikörper-Enzym-Konjugate durch die Detektion der Peroxidaseaktivität in Anwesenheit von 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin. Die Enzymaktivität wird dabei über die Absorption bei 450 nm photospektrometrisch nach Azidifikation der entstandenen Produkte bestimmt.

Lösungen und Medien

Beschichtete Mikrotiterplatte (monoklonal Ratte/Maus anti-Leptin)	96 well	
Ratte/Maus Leptin-Antiserum (Anti-Nagetierleptinserum)	6 ml	
10x HRP Waschpufferkonzentrat (10-fach konzentriertes Tris-gepuffertes Salz mit Tween-20, 50 mM)	50 ml	1:10 mit Aqua dest. verdünnen
Maus-Leptin ELISA-Standards (Mausleptin Standardreihe: 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30 ng/ml)	0,5 ml	
Qualitätskontrollen 1 und 2 (verschiedene Peptide inklusive Leptin)	0,5 ml	
Ratte/Maus Leptin Matrixlösung (mit 0,08 % Natriumazid)	0,5 ml	
Assay-Puffer (0,05 M Phosphatsalz pH 7,4; 0,025 M EDTA; 0,08 % Natriumazid; 0,05 % Triton X-100 und 1 % BSA)	40 ml	
Ratte/Maus-Leptin Erkennungsantikörper (biotinylierter Anti-Mausleptin-Antikörper)	12 ml	
Enzymlösung (Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugationspuffer)	12 ml	
Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	12 ml	
Stopplösung (0,3 M HCL)	12 ml	

2.5.1 Proben und Ablauf

Alle Reagenzien und Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht. Pro Probe und Standard wurden je drei Kavitäten (Triplets) verwendet. Der Testvorgang beinhaltete im Einzelnen folgende Schritte:

Nach Herstellen des HRP-Waschpuffers gemäß Anleitung folgte ein dreimaliges Waschen der Vertiefung mit je 300 µl Waschpuffer und anschließendem Abkippen der Lösung. In die noch feuchten Kavitäten wurden für die Bestimmung des Hintergrunds, des Standards, der QC1 und QC2 je 30 µl Assaypuffer pipettiert und mit 10 µl Matrixlösung aufgefüllt. Die Kavitäten für die Bestimmung der Proben erhielten jeweils 40 µl Assaypuffer. Es folgte ein zusätzliches Pipettieren von 10 µl Assaypuffer in die Kavitäten des Hintergrundes in Triplets und 10 µl Maus-Leptin-Standard in ansteigenden Konzentrationen entsprechend der jeweiligen Kavitäten. Jeweils 10 µl QC1 und QC2 wurden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Es wurden 10 µl der Proben in Triplets auf die Probenkavitäten aufgetragen. In jede Kavität wurden zusätzlich 50 µl Antiserum gegeben und die Mikrotiterplatte anschließend abgedunkelt bei Raumtemperatur (18 – 20 °C) für 2 Stunden auf dem Plattenschüttler bei 450 rpm inkubiert. Es folgt ein dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit je 30 µl Waschpuffer. Nach Hinzufügen von je 100 µl des Nachweisantikörpers folgt eine einstündige Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte auf dem Plattenschüttler bei Raumtemperatur und 450 rpm. Nach erneutem Waschen mit je 30 µl Waschpuffer wurden je 100 µl Enzympuffer pro Kavität hinzugefügt und die Platte erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert. Es folgt ein sechsmaliges Waschen mit je 30 µl Waschpuffer und Hinzufügen von 100 µl Substratpuffer pro Kavität. Die Mikrotiterplatte wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert, wodurch ein Farbumschlag nach blau entstand, der mit der Leptinmenge korreliert. Nach Addition der Stopplösung erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb als Zeichen der Azidifikation. Die Messung der Leptinkonzentration erfolgt bei 450 nm und 590 nm im ‚VICTOR™ Mikrotiterplatten Photometer‘ (Perkin Elmer, Rodgau).

2.6 Blutlipidparameter und Blutbild

2.6.1 Bestimmung der Blutlipidparameter

Für die Ermittlung der jeweiligen Menge an Triglyceriden und Cholesterin im Blut wurden jeweils 30 µl Vollblut auf einen Teststreifen gegeben und dieser anschließend im Reflotron[®] (Roche, Rotkreuz, Schweiz) analysiert. Das Verfahren beruht auf der Reflexionsmessung auf Basis einer Farbentwicklung der Teststreifen nach Zugabe des Mediums. Die durch das Messgerät detektierten Mengen wurden tabellarisch zusammengefasst.

2.6.2 Erstellen der Blutbilder

Die Blutbilder der einzelnen Tiere wurden am Hämatologiesystem/Blutbildautomat ,ADVIA[®] 2120‘ (Siemens, Eschborn) erstellt. Für jedes Blutbild wird eine Analysemenge von 100 µl benötigt. Diese wurde in einem Mischverhältnis 1:4 bestehend aus 25 µl Vollblut und 75 µl Aqua dest. hergestellt. Vor der jeweiligen Messung wurde in der Gerätesoftware der verwendete Mausstamm ausgewählt. Für die bei der Zellzählung zu berücksichtigenden Verdünnung der Blutprobe (1:4), wurde im Programm ,Dilution 4‘ ausgewählt.

Bei der Detektion der einzelnen Blutzellen arbeitet das Gerät mit verschiedenen Lichtmessmethoden. Dabei passiert eine konstante Analysemenge den Messbereich und wird von Schmal-Winkel streuendem Licht (2° - 3°) und Weit-Winkel streuendem Licht (5° - 15°) durchleuchtet. Das Gerät charakterisiert so die einzelnen Blutzellen nach der Größe der Zelle oder des Nukleus sowie der nukleolären Konfiguration (Gestalt und Dichte).

2.7 Triglyceride und Proteingehalt der Leber

2.7.1 Herstellen der Proben

Es wurden 30 mg N₂-fixierte Leber eingewogen und anschließend in 1 ml HB-Puffer homogenisiert. Dieses erfolgte für 20 Sekunden mithilfe des Dispergiergerätes ,Ultra-Turrax[®]‘ (IKA, Staufen). Das entstandene Homogenisat inkubierte zur Enzyminaktivierung für 5 Minuten bei 70 °C schüttelnd im Thermomixer. Nach Abkühlen (5 Minuten) auf Eis, erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm. Es wurden nur klare Überstände für die Gehaltsbestimmung verwendet.

2.7.2 Ermittlung des Triglyceridgehaltes der Leber

Die Bestimmung des Triglyceridgehaltes der Leber erfolgte unter Verwendung des ‚Randox[®] Triglycerid Assay TR210‘ (Randox, Krefeld).

Lösungen und Medien

A) Randox[®] Triglycerid Assay

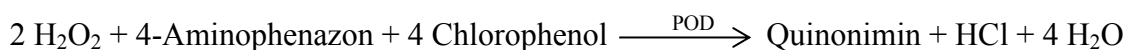
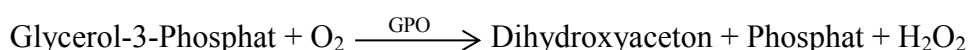
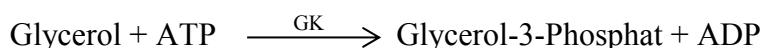
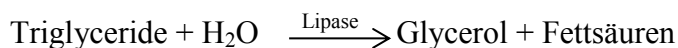
Inhalt	Konzentration im Test
<i>RIa. Puffer</i>	
Pipes Buffer (1,4-Piperazindiethansulfonsäure)	40 mmol/l, pH 7,6
4-Chlor-Phenol	5,5 mmol/l
Magnesium-Ionen	17,5 mmol/l
<i>RIb. Enzym Reagenz</i>	
4-Aminophenazon	0,5 mmol/l
ATP	1,0 mmol/l
Lipase	≥ 150 U/ml
Glycerol-Kinase	≥ 0,4 U/ml
Glycerol-3-Phosphat Oxidase	≥ 1,5 U/ml
Peroxidase	≥ 0,5 U/ml
<i>CAL. Standard</i>	

B) weitere Lösungen

<i>HB-Puffer</i>	
Natriumdihydrogenphosphat	10 mM
EDTA	1 mM
Polyoxyethylen-10-tridecylether	1 %, pH 7,4

2.7.3 Spezifische Methode der Messung

Die Triglyceride wurden nach einer hydrolytischen Spaltung durch Lipasen bestimmt. Der Indikator ist ein Quinonemin, welches durch die Hydrogen-Peroxidase, 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol unter dem katalytischen Einfluss der Peroxidase (POD) gewonnen wurde. Dabei lief folgende Reaktionskette ab:



(GK: Glycerol-Kinase, GPO: Glycerol-3-Phosphat Oxidase)

Triglyceridbestimmung

Zunächst wurden 15 ml RIa Puffer mit einer Flasche (15 ml) RIb Reagenz vermischt.

Es wurde eine Standardreihe aus dem Assay nach folgendem Schema hergestellt (Standard-Glycerol: 1960 µg/ml):

	TG-Konzentration in µg/ml	Standard in µl	HB-Puffer in µl
Standard 1	61,25	3,12	96,9
Standard 2	122,5	6,25	93,8
Standard 3	245	12,5	87,5
Standard 4	490	25	75
Standard 5	980	50	50
Standard 6	1470	75	25
Standard 7	1960	100	-
Leerwert	-	-	100

Jeweils 10 µl der Proben, des Standards und des Leerwertes wurden pro Kavität in Triplets pipettiert und mit 150 µl Reagenz aufgefüllt. Nach einer 10 minütigen Inkubation im Dunkeln

bei Raumtemperatur (18-25 °C) auf dem Plattenschüttler erfolgte eine photometrische Messung bei 490 nm am ,VICTOR™, Mikrotiterplatten Photometer (Perkin Elmer, Rodgau). Messergebnisse, die nicht innerhalb des Bereiches der Standardreihe lagen, wurden 1:2 mit HB-Puffer verdünnt und anschließend erneut inkubiert und gemessen.

Es erfolgte eine Rückrechnung der erhaltenen Messwerte anhand der Standardreihe, um die Menge der Triglyceride zu erhalten.

2.7.4 Bestimmung der Proteinmenge

Da der Triglyceridgehalt der Leber im Verhältnis zu 1 ml Protein bestimmt wurde, sind die Proteinmengen der Leber gemessen worden. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Leber erfolgte unter Verwendung des QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma, München).

Lösungen und Medien

A) QuantiPro™ BCA Assay Kit

<i>QA</i>	<i>Puffer</i> Natriumkarbonat Natriumtartrat Natriumbikarbonat NaOH	0,2 M, pH 11,25
<i>QB</i>	<i>BCA</i> Bicinchoninsäure	4 %, pH 8,5
<i>QC</i>	<i>Reagenz</i> Kupfer-(II)-Sulfat Pentahydratlösung	4%
<i>Serum</i>	<i>Standard</i> Bovines Serumalbumin NaCl Natriumazid	1,0 mg/ml 0,15 M 0,05 %

B) Weitere Lösungen

HB-Puffer		
Natriumdihydrogenphosphat		10 mM
EDTA		1 mM
Polyoxyethylen-10-tridecylether		1 %, pH 7,4
1x PBS		
NaCl		8 g
KCl		0,2 g
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O		1,424 g
KH ₂ PO ₄		0,2 g
Aqua dest.		800 ml
H ₂ O		200 ml

2.7.5 Spezifische Methode der Messung

Das Prinzip der Methode basiert auf einer alkalischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Cystein sowie Cystin und die anschließende Komplexbildung des Cu^{1+} mit Bicinchoninsäure. Aufgrund dieser letzten endothermen Reaktion erfolgt bei Inkubation im Brutschrank bei 65 °C für eine Stunde ein sichtbarer Farbumschlag von grün-blau zu Violett.

Proteinbestimmung

Zunächst wurden die drei Reagenzien des QuantiPro™ BCA Assay Kit im Verhältnis QA:QB:QC = 25:25:1 gemischt, die jeweiligen Volumina zuvor für die Anzahl der zu bestimmenden Probenanzahl errechnet. Es folgte die Herstellung einer Standardreihe nach folgendem Schema:

Proteinkonzentration in µg/ml	BSA in µl	HB-Puffer in µl	1x PBS in µl
30	30	30	940
25	25	25	950
20	20	20	960
15	15	15	970
10	10	10	980
5	500 (aus Verdünnung 10 µg/ml)		500
2,5	500 (aus Verdünnung 5 µg/ml)		500
1,25	500 (aus Verdünnung 2,5 µg/ml)		500
0	-	-	500

Die jeweiligen Proben wurden 1:100 verdünnt aus jeweils 5 µl reine Probe, 5 µl HB-Puffer und 490 µl 1x PBS.

Es wurden jeweils 100 µl Probe oder Standard pro Kavität in Triplets aufgetragen und mit 100 µl BCA-Lösung aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation von einer Stunde im Brutschrank bei 65 °C und eine anschließende photometrische Messung am Mikrotiterplatten Photometer bei 560 nm.

Die nun erhaltenen Messwerte wurden mit Hilfe der Standardreihe zurückgerechnet, um die einzelnen Mengen an Protein in der Probe zu erhalten.

2.8 Histologische Untersuchungen zur Bestimmung der β-Zellmasse

2.8.1 Herstellen der Präparate

Für die Bestimmung der β-Zellmasse wurden zunächst Schnittpräparate hergestellt. Hierfür wurden die Paraffinblöcke mit den eingebetteten Pankreata in das Mikrotom (Leica, Wetzlar) eingespannt und eine Schnittserie bestehend aus 3 Schnitten mit jeweils 1 µm Schichtdicke hergestellt. Zwischen den einzelnen Schnitten wurden je 200 µm verworfen. Nach Überführung der Schnitte in das Wasserbad, wurden diese einzeln mit einem Objektträger glatt aufgegriffen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.8.2 Immunfluoreszenz für Paraffinschnitte

Lösungen

Rotihistol

Rotihistol 1:1 in Ethanol absolut

Ethanol absolut

95 % Ethanol (190 ml Ethanol absolut + 10 ml Aqua dest.)

70 % Ethanol (140 ml Ethanol absolut + 60 ml Aqua dest.)

50 % Ethanol (100 ml Ethanol absolut + 100 ml Aqua dest.)

1x PBS (siehe 2.3.5.2.1)

PBS + 0,1 % Triton X-100

10 % Serum (in 1x PBS) des Wirtes des Sekundär-Antikörper (Donkey)

Entparaffinisieren

Zur histomorphologischen Beurteilung wurden die in Formalin fixierten Pankreata in Paraffin eingebettet, 1 µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt und diese über Nacht, fixiert auf einem Objektträger, getrocknet.

Zum Entparaffinisieren wurden die einzelnen Schnitte zunächst 5 min in Rotihistol, dann 5 min in Rotihistol-Ethanol-Gemisch (1:1) gewaschen. Es folgte eine absteigende Ethanolreihe für jeweils 5 min (Ethanol absolut – 95 % Ethanol – 70 % Ethanol – 50 % Ethanol) und anschließendes Spülen mit kaltem fließenden Leitungswasser.

Färbung

Die Schnitte wurden in 1x PBS überführt und anschließend für 20 min im PBS-Triton-Gemisch belassen. Nach folgendem dreimaligem Waschen mit 1x PBS, 30 min Blockieren mit 10 % Serum (Donkey) und weiterem dreimaligen Waschen wurde der primäre Antikörper Meerschweinchen-anti-Insulin (1:500, polyklonal) aufgetragen und für eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert. Dann wurde der sekundäre Antikörper Esel-anti-Meerschweinchen für eine Stunde aufgetragen und die Schnitte mit einem Deckglas und Nagellack fixiert.

Die Beurteilung der Inselgröße erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen).

2.8.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Das Prinzip der Immunfluoreszenz basiert auf dem Detektieren und Binden der primären Antikörper an spezifische Antigene und anschließendem Markieren der Primärantikörper durch modifizierte sekundäre Antikörper. Dabei sind die Sekundärantikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und werden fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Bei der Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop (dunkler Raum, nur Laser des Mikroskops mit definierter Wellenlänge) strahlt das Licht auf einen Anregungsfilter, der die Anregungswellenlänge herausfiltert. Der resultierende Strahl trifft auf einen dichroitischen Spiegel mit einer kritischen Wellenlänge. Kurzwelliges Anregungslicht wird reflektiert, tritt durch das Objektiv, das den Strahl konzentriert. Dieser Strahl gelangt auf das Präparat und regt die Fluoreszenzfarbstoffe an, wodurch sie in einen energetisch höheren Zustand übergehen. Durch Zerfall der Moleküle in den Grundzustand, unter Emission eines Photons, entsteht eine Energiedifferenz/Wellenlängenverschiebung zwischen Absorptions- und Emissionslicht. Das wellenlängere Emissionslicht wird im Objektiv gebündelt und auf den Spiegel gelenkt und passiert diesen. Ein Filter entfernt das Anregungslicht, so dass das Emissionslicht auf den Detektor fällt. Dort erscheint die Probe in der jeweiligen Emissionsfarbe vor einem schwarzen Hintergrund. Dadurch lassen sich Lokalisation und Menge der Proteine bzw. Hormone, wie Insulin, im Gewebe bestimmen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff ‚4',6-Diamidin-2-Phenylindol‘ (DAPI; blau, Absorption bei 350 nm, Emission bei 470 nm).

Der bei der Insulinfärbung verwendete Sekundärantikörper ist mit dem Chromogen ‚DyLight 649‘ (rot, Absorption bei 654 nm, Emission bei 673 nm) gekoppelt.

2.8.4 Berechnung der β -Zellmasse

Um die β -Zellmasse berechnen zu können, wurde zunächst die insulinpositive Fläche (Inselfläche) am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Hierfür wurden für jeden einzelnen Schnitt die Inselflächen aufgesucht und sowohl die Anzahl als auch die Größe bestimmt. Dann wurde die Gesamtsumme der einzelnen Inselgrößen pro Schnitt ins Verhältnis zur Gesamtfläche des entsprechenden Schnittes gesetzt. Hieraus ergab sich der prozentuale Anteil der Inselflächen am Schnitt. Dieser Anteil wurde abschließend von der gewogenen Pankreasmasse berechnet, um die β -Zellmasse des Tieres zu erhalten.

2.9 Statistische Auswertung und Graphiken

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgte die Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. Die Signifikanz-Prüfung erfolgte, soweit nicht anders angegeben, durch einen *Student's t-Test*, bei multiplen Vergleichen durch einen *ANOVA-Test* mit anschließendem *Bonferroni Post-Test*. Alle statistischen Berechnungen sowie Diagramme wurden mit dem *Graph Pad Prism* Programm Version 5 (Graph Pad Inc., USA) durchgeführt und erstellt.

3 Resultate

3.1 Lipidbelastungsstudie der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere

Die metabolische Belastung wurde durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich das Gewicht der Stämme B6-mt^{FVB} (FVB) und B6-mt^{AKR} (AKR) unter einer Hochfettdiät (HFD) im Vergleich zur Kontrolldiät (CD) entwickelt und inwiefern die Genvariante des *mt-Atp8-Gens* eine Auswirkung auf die Gewichtsentwicklung der Tiere der jeweiligen Gruppe nimmt. Dafür erhielt eine Gruppe eine fettreiche Diät, bei der 60 % der kcal aus Fett geboten werden, eine andere eine fettarme Kontrolldiät mit 10 % der kcal aus Fett. Die Tiere wurden jeweils getrennt nach Stamm, Mutation und Geschlecht bewertet. Hierfür wurde das Körpergewicht beider Stämme zweiwöchentlich über einen Messzeitraum von sechs Monaten gemessen.

3.1.1 Gewichtsverlauf der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere

Die weiblichen Tiere hatten zu Beginn der Studie ein Ausgangsgewicht von 17 g in beiden Stämmen. Beide Stämme nahmen im Verlauf an Gewicht zu. Tiere, die die Hochfettdiät erhielten, zeigten eine stärkere Gewichtszunahme.

Im Stamm B6-mt^{FVB} hatten die Hochfett gefütterten Tiere nach 10 Wochen ein signifikant höheres Körpergewicht als die Kontrollgruppe ($p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.1).

Im Kontrollstamm B6-mt^{AKR} entwickelte sich bereits nach 6 Wochen ein signifikant höheres Gewicht (um 25 %) der Tiere unter Hochfettdiät verglichen mit der Kontrollgruppe unter fettarmer Diät (HFD 28 ± 1 g vs. CD 21 ± 2 g, $p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.1).

In dem 6 monatigen Beobachtungszeitraum zeigten beide Genotypen bezogen auf die jeweilige Diät eine unterschiedliche Gewichtszunahme. Dabei nahmen die B6-mt^{FVB} Tiere unter Hochfettdiät 10 % und unter Kontrolldiät 30 % weniger als die B6-mt^{AKR} Tiere an Gewicht zu; verglichen wurden die Gewichtszunahmen (Mittelwert des Endgewichts minus Mittelwert des Ausgangsgewichts) der Stämme (HFD: $30 \pm 1,5$ g vs. $33 \pm 1,3$ g; CD: $10 \pm 1,9$ g vs. $15 \pm 1,2$ g, s. Abb. 3.1).

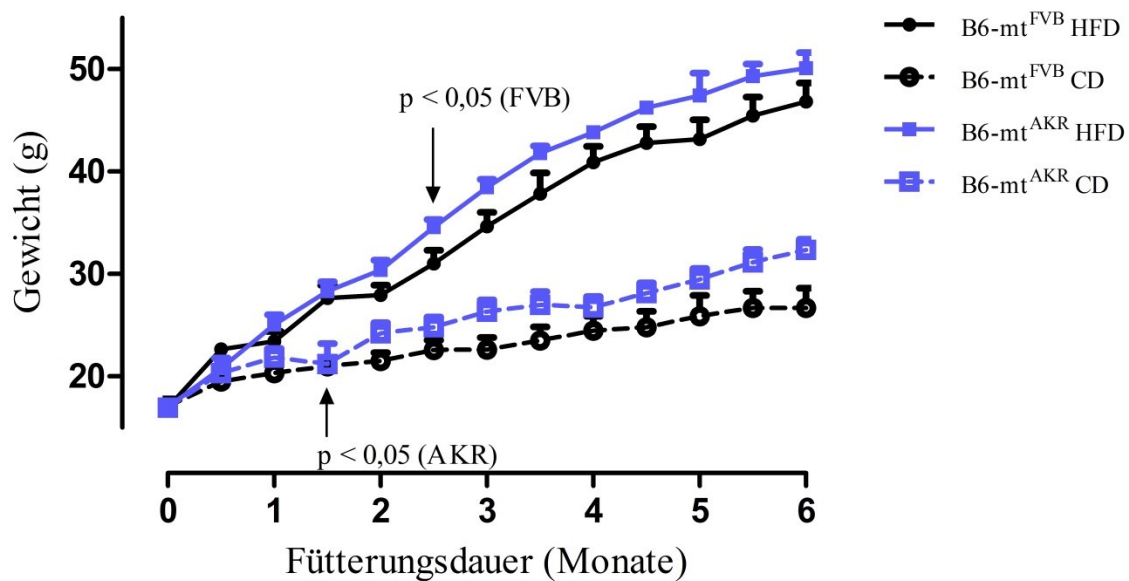


Abb. 3.1 Gewichtsverlauf der weiblichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere

Die Abbildung zeigt den Gewichtsverlauf der weiblichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere über sechs Monate unter HFD und CD (n = 6 - 12). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Die Gewichte wurden alle zwei Wochen durch eine Laborwaage ermittelt und der Durchschnitt zum Messzeitpunkt bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Die männlichen Tiere hatten zu Beginn der Studie aufgrund des Geschlechtsdimorphismus ein Ausgangsgewicht von 20 g. Die Tiere, die die Hochfettdiät erhielten, zeigten im Verlauf eine stärkere Gewichtszunahme als unter Kontrolldiät. Im Stamm B6-mt^{FVB} hatten die Hochfett gefütterten Tiere ab der 2. Woche ein signifikant höheres Gewicht um 25 % (HFD $33 \pm 1,3$ g vs. CD $24 \pm 0,6$ g; $p < 0,01$, One-Way ANOVA, s. Abb. 3.2).

Im Kontrollstamm der männlichen Tiere entwickelte sich ab der 4. Woche dieses signifikant höhere Gewicht bei den HFD-Tieren (HFD $33 \pm 1,4$ g vs. CD $24 \pm 0,6$ g; HFD $43 \pm 1,5$ g vs. CD $31 \pm 0,8$ g, $p < 0,01$, ANOVA, s. Abb. 3.2).

In dem sechs monatigen Beobachtungszeitraum wurden die Gewichtszunahmen (Mittelwert des Endgewichts minus Mittelwert des Ausgangsgewichts) der Stämme verglichen. Unter Hochfettdiät zeigte sich bei beiden Genotypen eine etwa gleiche Gewichtszunahme (Gewichtszunahme B6-mt^{FVB}: $32 \pm 1,1$ g vs. B6-mt^{AKR}: $31 \pm 1,5$ g). Unter Kontrolldiät nahmen die Tiere des B6-mt^{FVB} Stammes 20 % weniger an Gewicht zu als die des B6-mt^{AKR} Stammes (Gewichtszunahme B6-mt^{FVB} $16 \pm 0,9$ g vs. B6-mt^{AKR} $21 \pm 2,2$ g, $p < 0,01$, ANOVA, s. Abb. 3.2).

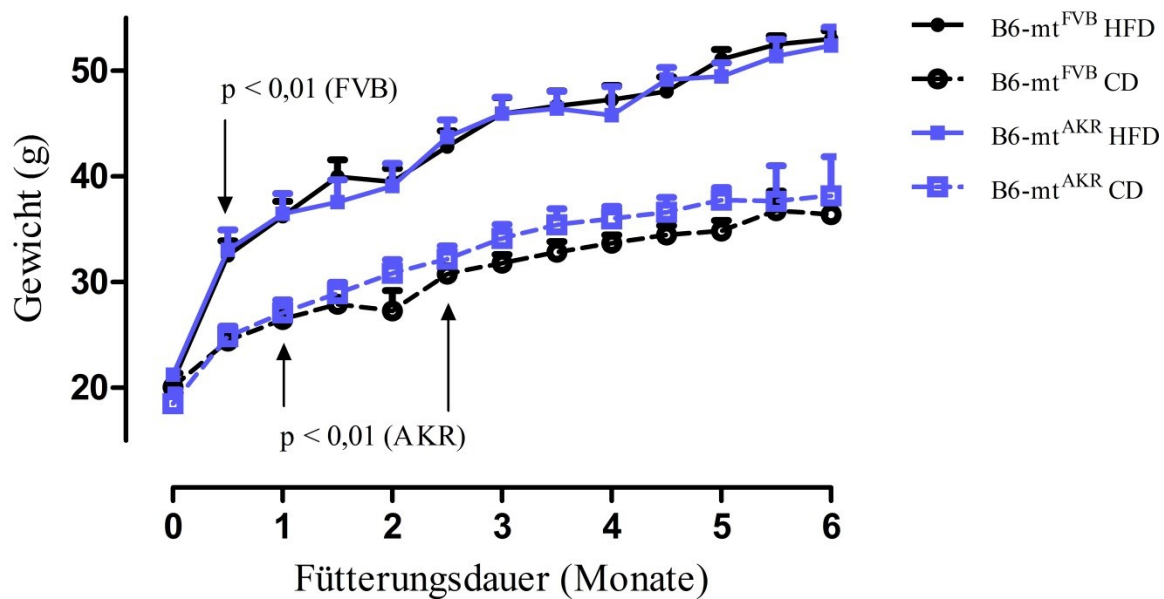


Abb. 3.2 Gewichtsverlauf der männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere

Die Abbildung zeigt den Gewichtsverlauf der männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere über sechs Monate unter HFD und CD (n = 6 - 15). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Die Gewichte wurden alle zwei Wochen durch eine Laborwaage ermittelt und der Durchschnitt pro Messzeitpunkt bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

3.1.2 Blutglucose

Für die Bestimmung der Blutglucose wurde wie unter 2.3.1 beschrieben vorgegangen. Hierfür wurde die Blutglucose alle vier Wochen über einen Zeitraum von sechs Monaten bestimmt.

Unter fettreicher Diät ließen sich für den conplastischen Mausstamm B6-mt^{FVB} und den Kontrollstamm B6-mt^{AKR} leicht höhere Blutglucosewerte messen als bei den Tieren unter Kontrolldiät (B6-mt^{FVB}: 7,15 – 9,07 mmol/l vs. 5,86 – 8,19 mmol/l; B6-mt^{AKR}: 6,82 – 8,20 mmol/l vs. 6,32 – 7,80 mmol/l). Der Unterschied blieb im Verlauf des Beobachtungszeitraumes bestehen.

Um Aussagen über die Auswirkung des *mt-Atp8-Gens* auf die Blutglucose treffen zu können, wurden die Blutglucosewerte einzeln nach Stamm und Fütterung betrachtet. Hierbei fiel auf,

dass die Tiere des Stammes B6-mt^{FVB} unter Hochfettdiät höhere Blutglucosewerte aufwiesen als die Tiere des Stammes B6-mt^{AKR} (AUC aus MW \pm SEM: B6-mt^{FVB} 48,35 vs. B6-mt^{AKR} 44,97). Im Verlauf der Messungen lagen die Blutglucosewerte im normoglykämischen Bereich ($\leq 9,0$ mmol/l; s. Abb. 3.3).

Bei den Tieren unter Kontrolldiät zeigte sich, dass zu Beginn die Blutglucosewerte der B6-mt^{FVB} Tiere niedriger und im Verlauf des Beobachtungszeitraums höher waren als bei den B6-mt^{AKR} Tieren. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Verlauf der Messung lag wie erwartet nicht vor, sowohl die weiblichen als auch die männlichen Tiere zeigten Blutglucosekonzentrationen im normoglykämischen Bereich.

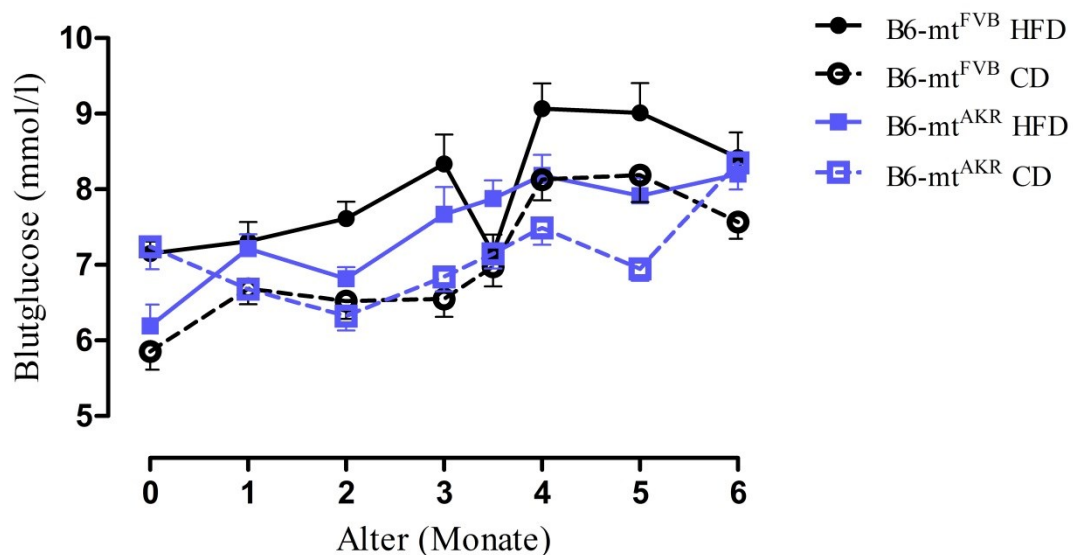


Abb. 3.3 Blutglucoseverlauf der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere

Die Abbildung zeigt den Blutglucoseverlauf der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere über sechs Monate unter HFD und CD (n = 16 - 20). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Die Blutglucosekonzentration wurde alle vier Wochen aus 0,3 μ l Vollblut mit einem Glucosemessgerät „FreeStyle Mini“ nach der Glucoseoxidase-Methode ermittelt und der Durchschnitt zum Messzeitpunkt bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt und die AUC bestimmt (siehe oben). Beide Genotypen lagen im normoglykämischen Bereich $< 9,0$ mmol/l.

3.1.3 Seruminsulinspiegel der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Maus

Die Seruminsulinspiegel der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter fettreicher und Kontrolldiät wurden nach drei und sechs Monaten bestimmt.

Nach drei Monaten wiesen die B6-mt^{FVB} Tiere unter HFD signifikant höhere Seruminsulinwerte wie der Kontrollstamm auf ($10,2 \pm 1,5 \mu\text{g/l}$ vs. $2,8 \pm 1,2 \mu\text{g/l}$; $p < 0,05$, ANOVA). Unter Kontrolldiät zeigten sich bei den B6-mt^{FVB} Tieren die Hälfte (50 %) der Seruminsulinkonzentration der B6-mt^{AKR} Tiere ($1,6 \pm 0,33 \mu\text{g/l}$ vs. $3,3 \pm 0,86 \mu\text{g/l}$). Die B6-mt^{FVB} Tiere hatten unter fettreicher Diät etwa den 6-fachen Seruminsulinspiegel wie unter Kontrolldiät, der Unterschied war signifikant ($10,2 \pm 1,5 \mu\text{g/l}$ vs. $1,6 \pm 0,33 \mu\text{g/l}$; $p < 0,001$; ANOVA; s. Abb. 3.4). Die B6-mt^{AKR} Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Unter beiden Diäten kam es bei den B6-mt^{FVB} Tieren zu einer Abnahme der Seruminsulinspiegel von drei auf sechs Monate. Bei den B6-mt^{AKR} Tieren kam es zu einer Zunahme des Insulinspiegels; die Zunahme war unter HFD signifikant ($2,8 \pm 1,12 \mu\text{g/l}$ vs. $9,9 \pm 1,8 \mu\text{g/l}$; $p < 0,05$; ANOVA; s. Abb. 3.4).

B6-mt^{FVB} Tiere zeigten nach sechs Monaten unter HFD höhere Seruminsulinkonzentrationen als unter CD (n.s.). Nach sechs Monaten CD hatten die B6-mt^{FVB} Tiere signifikant niedrigere Seruminsulinspiegel als der B6-mt^{AKR} Stamm ($0,7 \pm 0,3 \mu\text{g/l}$ vs. $8,9 \pm 3,5 \mu\text{g/l}$; $p < 0,01$; ANOVA). Die B6-mt^{AKR} Tiere zeigten auch zum zweiten Messzeitpunkt keine Unterschiede zwischen beiden Diäten.

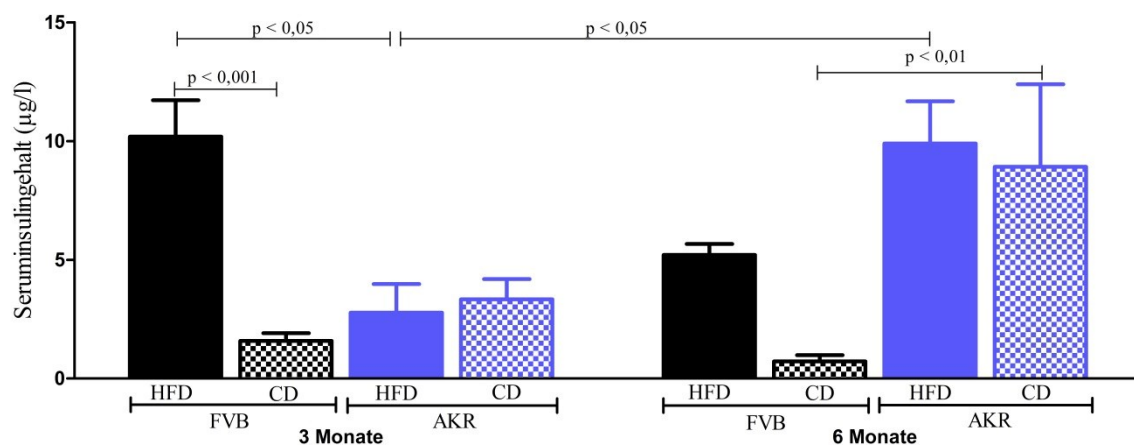


Abb. 3.4 Seruminsulinkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Seruminsulinkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD (n = 4 - 8). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde die Seruminsulinkonzentration mit einem ELISA ermittelt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert ± SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

3.1.4 β -Zellmasse

Die β -Zellmasse wurde wie unter 2.8.2 beschrieben nach immunhistochemischer Insulinfärbung am Fluoreszenzmikroskop bestimmt (s. Abb. 3.6 und 3.7) und die Zeitpunkte drei sowie sechs Monate miteinander verglichen.

Nach drei Monaten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb eines Stammes, unabhängig von der Diät. Ein leichter Unterschied bestand zwischen den beiden Stämmen. Die Tiere B6- mt^{FVB} wiesen unter Hochfettdiät und unter Kontrolldiät eine ca. 1,5-fach höhere β -Zellmasse auf (HFD: B6- mt^{FVB} $2,0 \pm 0,3$ mg vs. B6- mt^{AKR} $1,4 \pm 0,6$ mg; CD: B6- mt^{FVB} $1,8 \pm 0,3$ mg vs. B6- mt^{AKR} $1,1 \pm 0,3$ mg, s. Abb. 3.5).

Nach sechs Monaten zeigten die B6- mt^{AKR} Tiere unter HFD eine signifikant höhere (2,5-fach) und unter CD um 1/3 höhere β -Zellmasse als die B6- mt^{FVB} Tiere (HFD: $4,5 \pm 0,9$ mg vs. $1,8 \pm 0,4$ mg; $p < 0,05$; ANOVA; CD: $2,1 \pm 0,5$ mg vs. $1,5 \pm 0,2$ mg; s. Abb. 3.5). Diese Unterschiede ergaben sich aus den divergenten Entwicklungen der β -Zellmasse der beiden Stämme. Bei den B6- mt^{FVB} Tieren kam es nach sechs Monaten zu keiner signifikanten Veränderung der β -Zellmasse. Bei den B6- mt^{AKR} Tieren zeigte sich eine signifikante Zunahme der β -Zellmasse um das 3-fache unter Hochfettdiät und eine Verdopplung unter Kontrolldiät (HFD: 3 Monate $1,4 \pm 0,6$ mg vs. 6 Monate $4,5 \pm 0,9$ mg; $p < 0,01$; ANOVA; CD: 3 Monate $1,1 \pm 0,3$ mg vs. 6 Monate $2,1 \pm 0,5$ mg; s. Abb. 3.5).

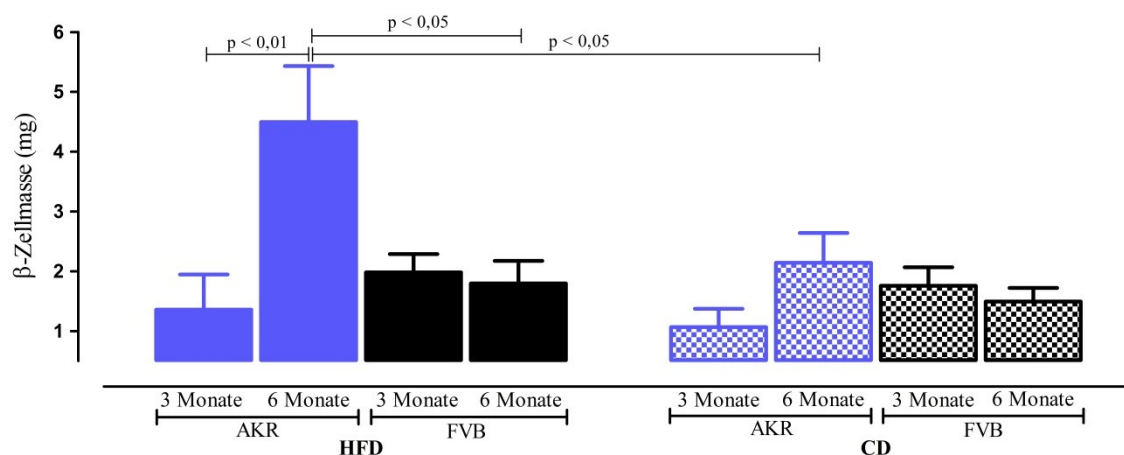
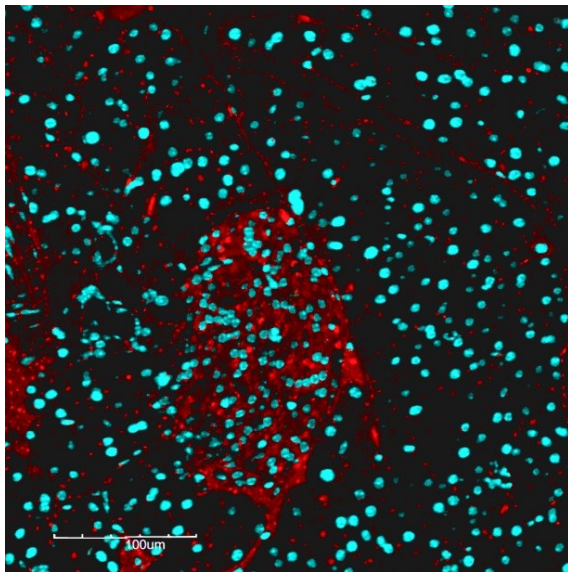
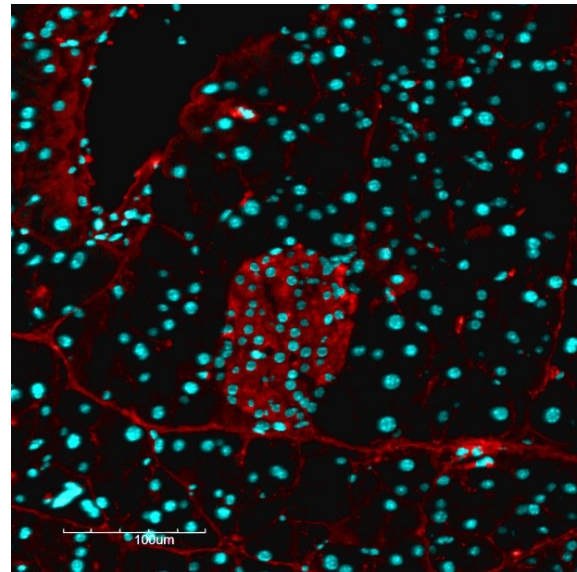


Abb. 3.5 β -Zellmasse der B6- mt^{FVB} und B6- mt^{AKR} Tiere unter HFD und CD

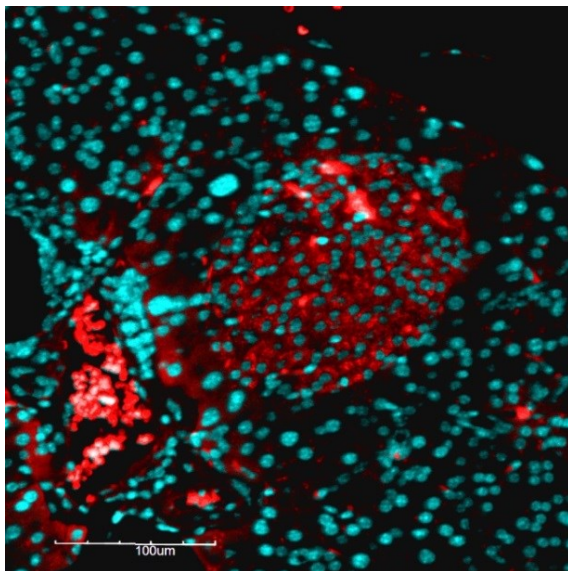
Die Abbildung zeigt die β -Zellmasse der B6- mt^{FVB} und B6- mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 4 - 5$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde die β -Zellmasse durch immunhistochemische Insulinfärbung fluoreszenzmikroskopisch ermittelt und der Durchschnitt bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.



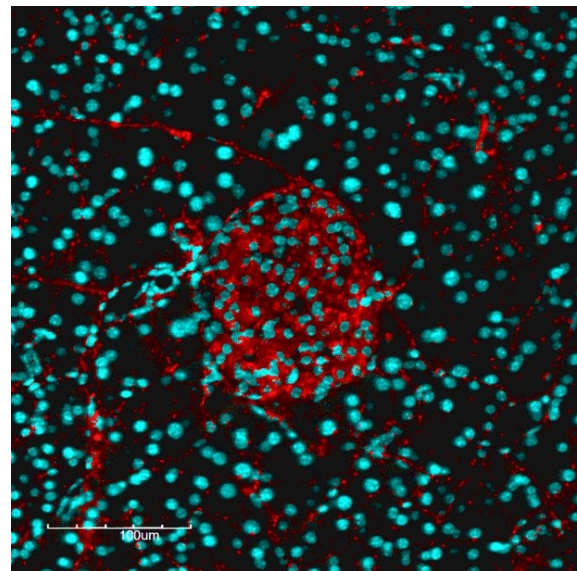
1 B6-mt^{FVB}, HFD, 3 Monate



2 B6-mt^{FVB}, HFD, 6 Monate



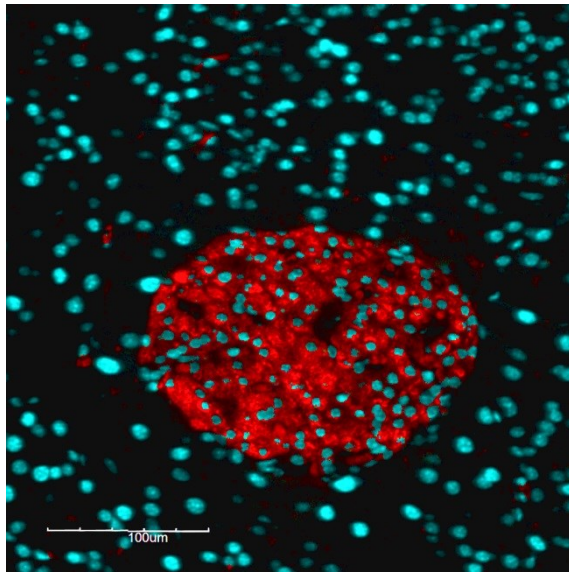
3 B6-mt^{FVB}, CD, 3 Monate



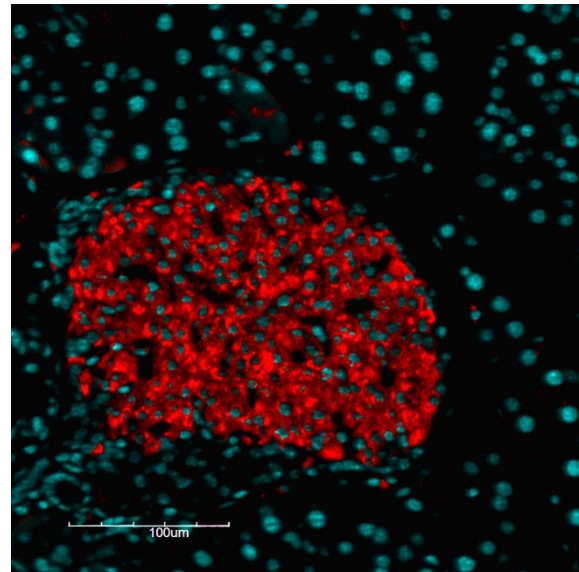
4 B6-mt^{FVB}, CD, 6 Monate

Abb. 3.6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Inseln nach immunhistochemischer Färbung von Insulin der B6-mt^{FVB} Tiere unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten

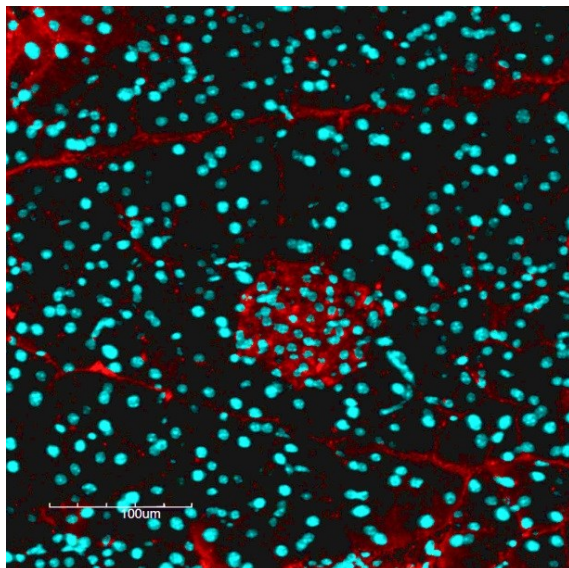
Die Abbildungen zeigen exemplarisch Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Inseln des endokrinen Pankreas der B6-mt^{FVB} Tiere unter Hochfettdiät nach 3 Monaten (1) und 6 Monaten (2), sowie unter Kontrolldiät nach 3 Monaten (3) und 6 Monaten (4). Die Insulin-positiven β -Zellen des endokrinen Pankreas sind rot dargestellt, die Zellkerne sind blau gefärbt. Unter HFD zeigten die B6-mt^{FVB} Tiere größere Inseln als unter CD.



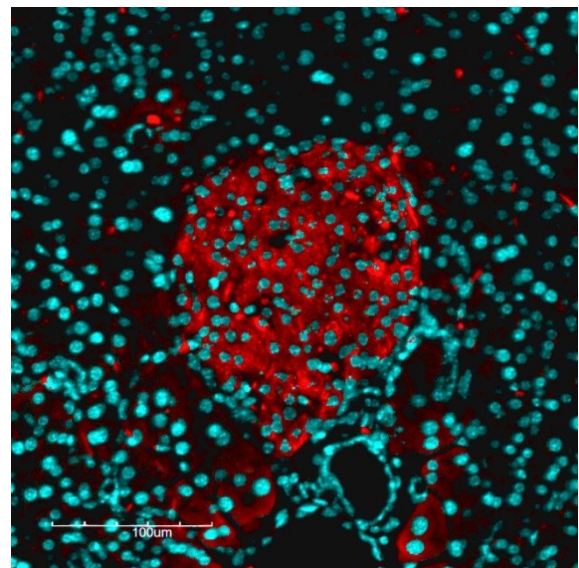
1 B6-mt^{AKR}, HFD, 3 Monate



2 B6-mt^{AKR}, HFD, 6 Monate



3 B6-mt^{AKR}, CD, 3 Monate



4 B6-mt^{AKR}, CD, 6 Monate

Abb. 3.7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Inseln nach immunhistochemischer Färbung von Insulin der B6-mt^{AKR} Tiere unter HFD und CD nach 3 sowie 6 Monaten

Die Abbildungen zeigen exemplarisch Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Inseln des endokrinen Pankreas der B6-mt^{AKR} Tiere unter Hochfettdiät nach 3 Monaten (1) und 6 Monaten (2), sowie unter Kontrolldiät nach 3 Monaten (3) und 6 Monaten (4). Die Insulin-positiven β -Zellen des endokrinen Pankreas sind rot dargestellt, die Zellkerne sind blau gefärbt. Unter HFD zeigten die B6-mt^{AKR} Tiere größere Inseln als unter CD.

3.1.5 Plasmaleptinspiegel der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Maus

Mit steigender Lipogenese und konsekutiver Zunahme der Adipozytenzahl steigt die Leptinproduktion in den Adipozyten. Das Leptin wird ins Blut sezerniert und bindet unter anderem im Hypothalamus an Leptinrezeptoren, wodurch die Ausschüttung orexigener Mediatoren gehemmt wird. Daraus resultiert eine verminderte Nahrungsaufnahme. Ein Mangel an Glucose und Fettsäuren, die Lipolyse und eine verminderte Adipozytenzahl hemmen somit die Leptinproduktion. Aus diesem Regelkreis heraus wurde der Leptinspiegel bestimmt. Es konnte so eruiert werden, welchen Einfluss die mitochondriale Mutation auf die Leptinproduktion hat.

Die Leptinspiegel der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere wurden unter fettreicher Diät und Kontrolldiät nach drei und sechs Monaten Fütterungsdauer bestimmt. Hierzu wurden auch die weiblichen und männlichen Tiere einzeln betrachtet.

Nach drei Monaten war die Leptinkonzentration in beiden Stämmen unter HFD signifikant mehr als doppelt so hoch wie unter CD (B6-mt^{FVB}: HFD $82,1 \pm 10,4$ ng/ml vs. CD $38,2 \pm 3,8$ ng/ml; $p < 0,01$; ANOVA; B6-mt^{AKR}: HFD $65,2 \pm 5,2$ ng/ml vs. CD $20,5 \pm 2,4$ ng/ml; $p < 0,01$, ANOVA). Unter HFD zeigten die B6-mt^{FVB} Tiere 30 % höhere Leptinspiegel als der Kontrollstamm B6-mt^{AKR}, unter CD fast das Doppelte.

Im Vergleich der beiden Messzeitpunkte zeigte sich im Stamm B6-mt^{AKR} unter HFD eine Zunahme der Leptinkonzentrationen um 10 % und unter CD um 50 %. Unter HFD kam es im Stamm B6-mt^{FVB} zu einer signifikanten Zunahme um 50 % ($p < 0,05$; ANOVA). Hingegen nahm die Leptinkonzentration bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter Kontrolldiät um 35 % ab.

Nach sechs Monaten zeigte sich ein signifikant höherer Leptinspiegel im B6-mt^{AKR} Stamm um mehr als das Doppelte, im Stamm B6-mt^{FVB} um etwa das 5-fache unter fettreicher Diät im Vergleich zur Kontrolldiät (B6-mt^{FVB}: HFD $123,3 \pm 16,4$ ng/ml vs. CD $25,2 \pm 7$ ng/ml; $p < 0,001$; B6-mt^{AKR}: HFD $70,9 \pm 10,2$ ng/ml vs. CD $31,9 \pm 5,9$ ng/ml; $p < 0,05$; ANOVA; s. Abb. 3.2). Unter HFD zeigten die B6-mt^{FVB} Tiere fast doppelt so hohe Leptinkonzentrationen wie der Stamm B6-mt^{AKR} ($p < 0,001$, ANOVA, s. Abb. 3.8).

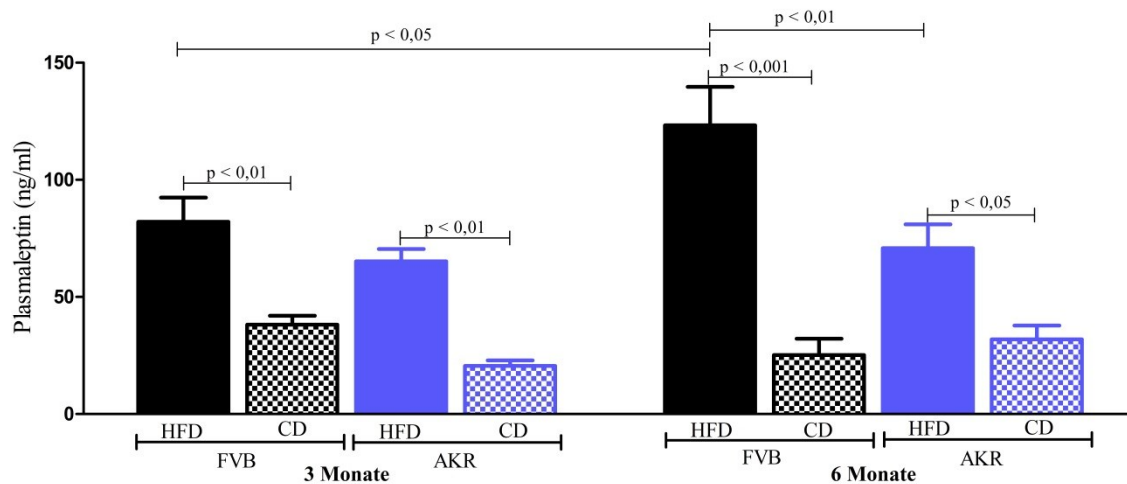


Abb. 3.8 Plasmaleptinkonzentrationen der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmaleptinkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD (n = 5 - 8). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde die Plasmaleptinkonzentration durch einen ELISA ermittelt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In der Betrachtung der Leptinspiegel nach dem Geschlecht fiel auf, dass in der Gruppe der weiblichen Tiere die Leptinkonzentration nach drei Monaten in beiden Genotypen unter HFD signifikant höher lagen als unter CD (B6-mt^{FVB}: $99,3 \pm 9,1$ ng/ml vs. $41,6 \pm 7,6$ ng/ml; $p < 0,001$, ANOVA; B6-mt^{AKR}: $61,9 \pm 7,3$ ng/ml vs. $17,6 \pm 2,3$ ng/ml; $p < 0,05$, ANOVA). Unter beiden Diäten konnte für die B6-mt^{FVB} Weibchen eine höhere Leptinkonzentration im Vergleich zu den B6-mt^{AKR} Weibchen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9).

Der Vergleich der beiden Messzeitpunkte wies bei den weiblichen Tieren eine Abnahme der Leptinwerte innerhalb des Stammes B6-mt^{FVB} unter fettarmer Diät auf. Im selben Stamm unter HFD und im Stamm B6-mt^{AKR} unter CD nahm die Leptinkonzentration zu. Bei den B6-mt^{AKR} Weibchen unter HFD gab es keine signifikanten Veränderungen.

Nach sechs Monaten war der Leptinspiegel bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter HFD signifikant höher als unter CD (HFD: $115,1 \pm 9,9$ ng/ml vs. CD: $5,8 \pm 1,0$ ng/ml; $p < 0,001$; ANOVA). Es zeigte sich, dass die B6-mt^{FVB} Tiere unter HFD signifikant höhere Leptinspiegel hatten als der Kontrollstamm ($p < 0,01$; ANOVA).

Die männlichen Tiere zeigten zu beiden Zeitpunkten in beiden Genotypen unter HFD signifikant höhere Leptinkonzentrationen als unter CD ($p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.10)

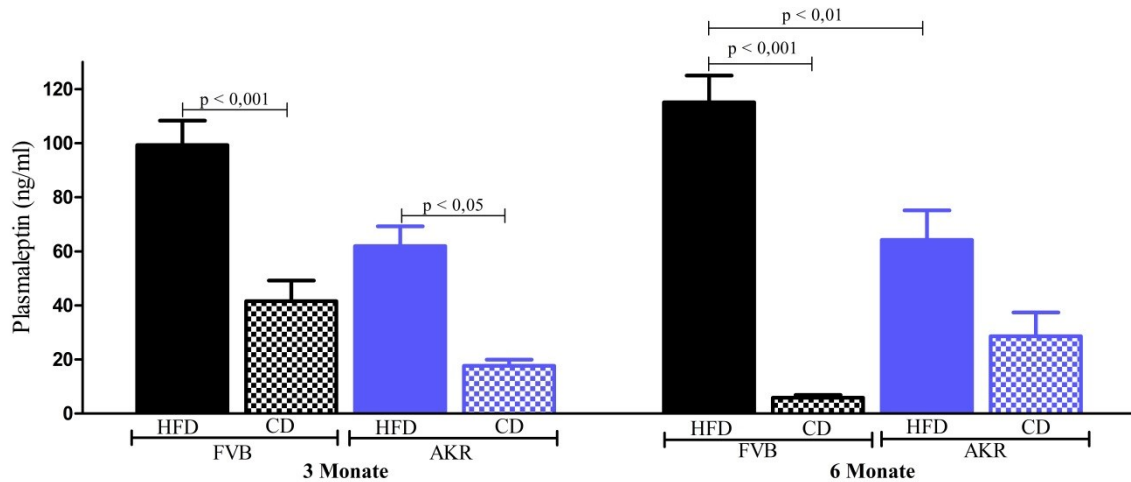


Abb. 3.9 Plasmaleptinkonzentrationen der weiblichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmaleptinkonzentrationen der weiblichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD (n = 4). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde die Plasmaleptinkonzentration durch einen ELISA ermittelt und der Durchschnitt bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

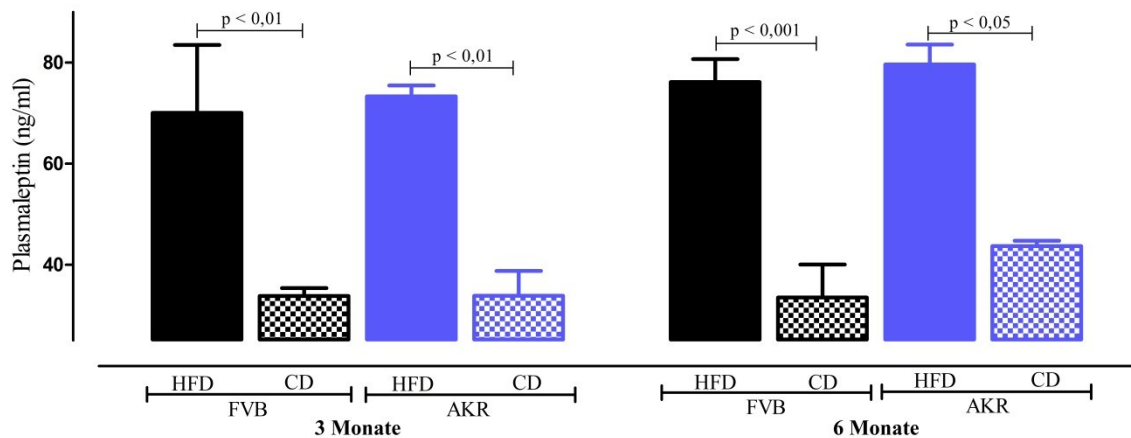


Abb. 3.10 Plasmaleptinkonzentrationen der männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmaleptinkonzentrationen der männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD (n = 4 - 5). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde die Plasmaleptinkonzentration durch einen ELISA ermittelt und der Durchschnitt bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

3.2 Blutbilder

Für die einzelnen Tiere wurde wie unter 2.6.2 beschrieben ein Differenzialblutbild erstellt. Die Entnahme des Blutes erfolgte jeweils nach 3 und 6 Monaten Diätdauer. Hierbei wurden die Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter fettreicher und Kontrolldiät betrachtet.

3.2.1 Erythrozyten

Die Anzahl der Erythrozyten lag bei beiden Genotypen unter beiden Diäten zu den entsprechenden Zeitpunkten innerhalb des Referenzbereichs ($7,0 - 10,1 \cdot 10^6/\mu\text{l}$). Bei den B6-mt^{AKR} Tieren gab es zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Diäten. Die B6-mt^{FVB} Tiere hatten unter HFD zu beiden Zeitpunkten weniger Erythrozyten pro μl Vollblut. Im Verlauf von 3 Monaten zu 6 Monaten sank die Anzahl der Erythrozyten um 15 % bei den B6-mt^{FVB} Tieren und 5 % bei den B6-mt^{AKR} Tieren. Es fiel auf, dass die B6-mt^{FVB} Tiere eine niedrigere Anzahl an roten Blutzellen hatten als die B6-mt^{AKR} Tiere. (Abb. 3.11).

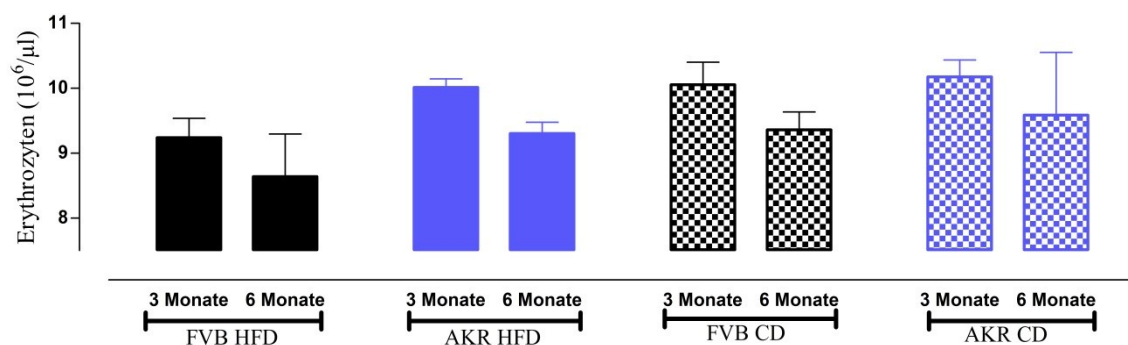


Abb. 3.11 Anzahl der Erythrozyten der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Erythrozyten pro μl Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 6 - 9$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde aus 100 μl Probe (25 μl Vollblut + 75 μl Aqua dest.) die Anzahl der Erythrozyten automatisch am Hämatologiesystem „ADVIA®“ gezählt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Stämmen unter den Diäten und Zeitpunkten waren nicht signifikant.

3.2.2 Leukozyten

Die Anzahl der Leukozyten lag ebenso für beide Genotypen konstant im Referenzbereich ($3,2 - 12,7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). Auch in dieser Zellreihe konnte eine Abnahme der Zellzahl von 3 Monaten zu 6 Monaten festgestellt werden. Bei den B6-mt^{FVB} Tieren verringerte sich die Leukozytenzahl um 25 % unabhängig von der Diät, bei den B6-mt^{AKR} Tieren verringerte sich die Anzahl um 5 % unter HFD und um 10 % unter CD. Unter fettreicher Diät wies der B6-mt^{FVB} Stamm zum ersten Messzeitpunkt eine höhere Zellzahl als der B6-mt^{AKR} Stamm auf. Dieser Zustand änderte sich zum zweiten Messzeitpunkt nach 6 Monaten ins Gegenteil. Unter Kontrolldiät zeigten B6-mt^{FVB} Tiere zu beiden Messzeitpunkten eine geringere Zellzahl als der Kontrollstamm. Es zeigte sich bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter CD eine geringere Zellzahl als unter Hochfettdiät. Im Gegensatz dazu wies der Kontrollstamm unter CD eine höhere Anzahl weißer Blutzellen auf als unter HFD (Abb. 3.12).

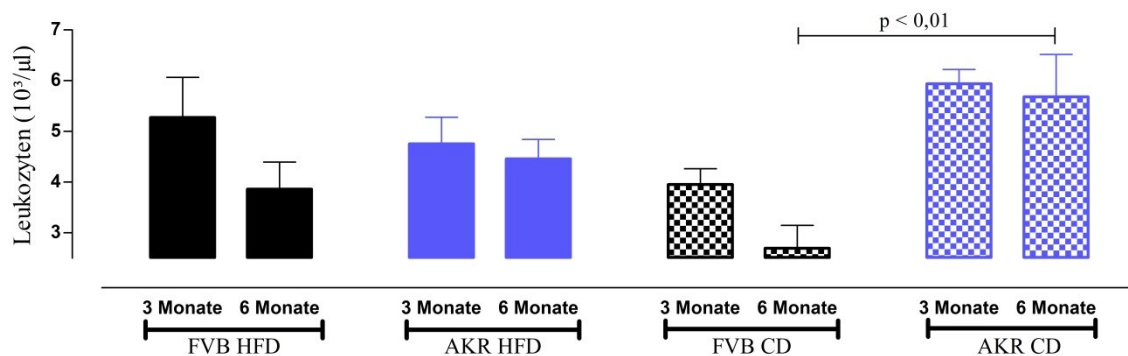


Abb. 3.12 Anzahl der Leukozyten der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Leukozyten pro μl Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 6 - 8$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde aus 100 μl Probe (25 μl Vollblut + 75 μl Aqua dest.) die Anzahl der Leukozyten automatisch am Hämatologiesystem ‚ADVIA®‘ gezählt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Für eine genauere Differenzierung wurden die einzelnen Subtypen der Leukozyten betrachtet und miteinander verglichen.

Neutrophile Granulozyten

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten lag bei beiden Genotypen konstant im Referenzbereich ($0,5 - 2,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ Vollblut). Nach 3 Monaten wiesen die B6-mt^{FVB} Tiere unter HFD mehr Zellen als unter CD auf ($0,19 \pm 0,028 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $0,15 \pm 0,03 \cdot 10^3/\mu\text{l}$), bei den B6-mt^{AKR} Tieren zeigte sich ein geringerer Unterschied ($0,17 \pm 0,02 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $0,18 \pm 0,02 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). Es konnte eine Zunahme der Anzahl von drei auf sechs Monate festgestellt werden. Diese war bei den B6-mt^{FVB} unter HFD ($p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.13) und bei den B6-mt^{AKR} Tieren unter CD ($p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.13) signifikant. Bei den B6-mt^{FVB} Tieren zeigten sich nach 6 Monaten unter CD 50 % mehr Zellen als unter HFD, bei den B6-mt^{AKR} Tieren 50 % weniger.

Unter HFD wiesen die B6-mt^{FVB} Tiere nach 6 Monaten 50 % weniger Zellen als die B6-mt^{AKR} Tiere auf, unter CD 50 % mehr (HFD: $0,23 \pm 0,038 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $0,34 \pm 0,047 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; CD $0,30 \pm 0,014 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. CD $0,23 \pm 0,023 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; s. Abb. 3.13).

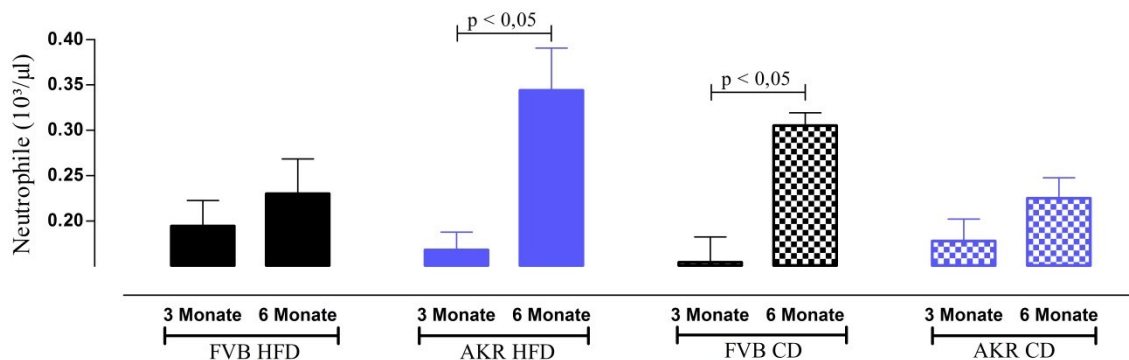


Abb. 3.13 Anteil der neutrophilen Granulozyten der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro μl Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 5 - 9$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurden aus 100 μl Probe (25 μl Vollblut + 75 μl Aqua dest.) die Anzahl der neutrophilen Granulozyten automatisch am Hämatologiesystem „ADVIA®“ gezählt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Lymphozyten

Die Anzahl der Lymphozyten lag bei beiden Genotypen nach drei Monaten im Referenzbereich ($3,8 - 8,9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ Vollblut), nach 6 Monaten bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter beiden Diäten niedriger. Es konnte eine Abnahme der Zellzahl von 3 Monaten zu 6 Monaten festgestellt werden. Nach drei Monaten wies der Stamm B6-mt^{FVB} unter HFD 10 % mehr Zellen, unter CD 30 % weniger Lymphozyten auf als der Kontrollstamm (B6-mt^{FVB} HFD $4,83 \pm 0,712 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. B6-mt^{AKR} HFD $4,42 \pm 0,497 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; B6-mt^{FVB} CD $3,61 \pm 0,252 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. B6-mt^{AKR} CD $5,24 \pm 0,443 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). Während die B6-mt^{FVB} Tiere unter HFD 35 % mehr Zellen als unter CD hatten, lagen bei den B6-mt^{AKR} Tieren 15 % weniger vor.

Nach 6 Monaten hatten die B6-mt^{FVB} Tiere unter beiden Diäten geringere Zellzahlen als die B6-mt^{AKR} Tiere, dieser Unterschied war unter CD signifikant ($2,49 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $4,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0,05$; ANOVA; Abb. 3.14).

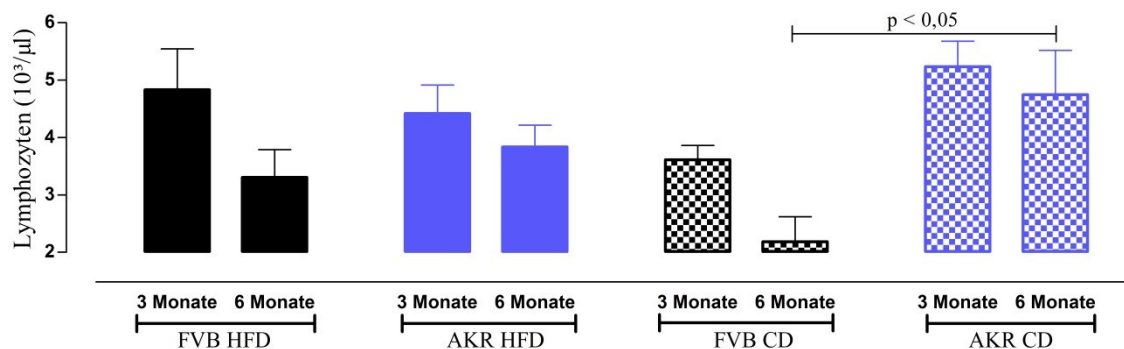


Abb. 3.14 Anteil der Lymphozyten der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Lymphozyten pro μl Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 6 - 9$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurden aus 100 μl Probe (25 μl Vollblut + 75 μl Aqua dest.) die Anzahl der Lymphozyten automatisch am Hämatologiesystem „ADVIA®“ gezählt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Monozyten

Die Anzahl der Monozyten lag bei beiden Genotypen zu beiden Zeitpunkten im Referenzbereich ($0,0 - 0,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ Vollblut). Im Stamm B6-mt^{FVB} unter Hochfettdiät halbierte sich die Zellzahl von 3 Monaten zu 6 Monaten, bei den B6-mt^{AKR} Tieren nahm sie um 40 % zu. Unter CD nahm bei beiden Stämmen die Zellzahl um ein Drittel (30 %) zu.

Nach 3 Monaten unter Hochfettdiät lag bei den B6-mt^{FVB} Tieren die Zellzahl dreimal so hoch wie bei den B6-mt^{AKR} Tieren, nach 6 Monaten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Unter CD gab es zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Bei den B6-mt^{FVB} Tieren ließ sich nach 3 Monaten eine signifikant höhere Anzahl der Monozyten um das 4-fache unter HFD im Vergleich zur CD nachweisen (B6-mt^{FVB} HFD $0,13 \pm 0,041 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. B6-mt^{FVB} CD $0,04 \pm 0,008 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.15).

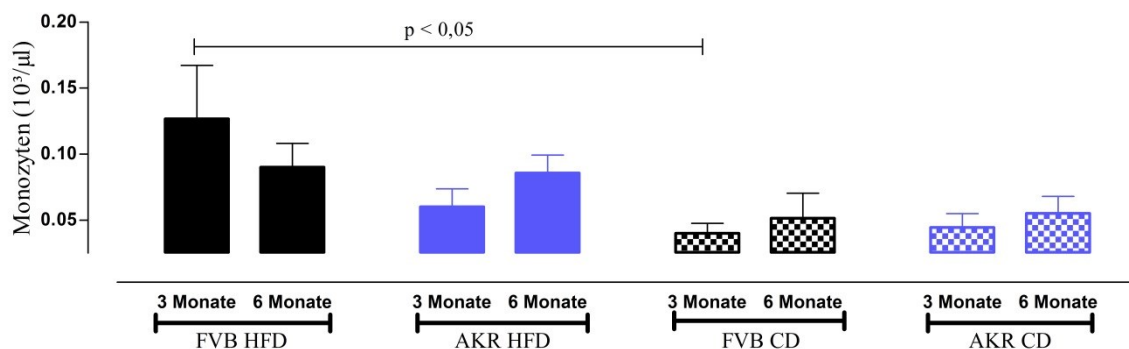


Abb. 3.15 Anteil der Monozyten der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Monozyten pro μl Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 6 - 9$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurden aus 100 μl Probe (25 μl Vollblut + 75 μl Aqua dest.) die Anzahl der Monozyten automatisch am Hämatologiesystem „ADVIA®“ gezählt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Eosinophile Granulozyten

Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten lag bei beiden Genotypen zu beiden Zeitpunkten im Referenzbereich ($0,0 - 0,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ Vollblut). Von 3 Monaten zu 6 Monaten verdoppelte sich die Zellzahl, im Stamm B6-mt^{FVB} unter HFD kam es zu einer Vervierfachung. Dieser Unterschied war im Stamm B6-mt^{FVB} unter Hochfettdiät ($0,05 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $0,19 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0,05$, ANOVA; s. Abb. 3.16) und Kontrolldiät signifikant ($0,06 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $0,19 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0,05$, ANOVA; s. Abb. 3.16).

Nach 3 Monaten zeigten die B6-mt^{FVB} Tiere unter beiden Diäten 30 % weniger Eosinophile als die B6-mt^{AKR} Tiere.

Nach 6 Monaten gab es unter beiden Diäten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen (s. Abb. 3.16).

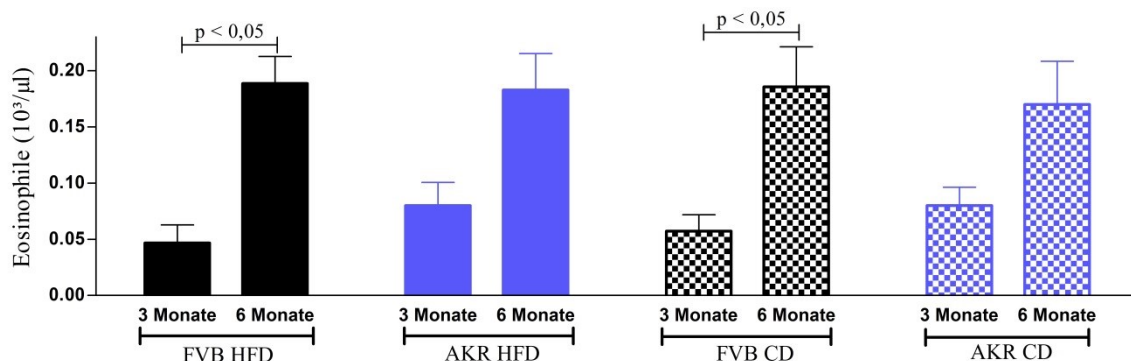


Abb. 3.16 Anzahl der eosinophilen Granulozyten der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Anzahl der eosinophilen Granulozyten pro μl Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 6 - 9$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurden aus 100 μl Probe (25 μl Vollblut + 75 μl Aqua dest.) die Anzahl der Granulozyten automatisch am Hämatologiesystem „ADVIA®“ gezählt und der Durchschnitt bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

3.3 Blutlipidparameter Cholesterin und Triglyceride der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter fettreicher und Kontrolldiät

Die Blutlipidparameter Cholesterin und Triglyceride spiegeln das Ausmaß einer metabolischen Belastung wider. Dabei steigen Cholesterinwerte sowohl als Zeichen einer Akkumulation des aufgenommenen Cholesterins aus tierischen Nahrungsbestandteilen, zum anderen aufgrund der endogenen hepatischen Cholesterinsynthese. Da im Lipidmetabolismus ATP essenziell ist, wird ersichtlich, dass Veränderungen der ATP-Syntheseleistung, wie durch das *mt-Atp8-Gen* bedingt, zu einer Anpassung der Cholesterinsynthese führen können. Dieser pathobiochemische Mechanismus war Grundlage für die in dieser Arbeit untersuchten Blutlipidmarker.

3.3.1 Cholesterin im Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter fettreicher und Kontrolldiät

Die Cholesterinwerte im Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere wurden, sowohl unter fettreicher Diät als auch Kontrolldiät, nach drei und sechs Monaten Fütterungsdauer bestimmt. Die Auswertung erfolgte auch nach geschlechtsspezifischer Trennung.

Nach drei Monaten zeigte sich innerhalb eines Genotyps wie erwartet, dass unter Hochfettdiät die Cholesterinkonzentrationen bei den B6-mt^{FVB} Tieren mit 20 % (156 ± 7 mg/dl vs. 129 ± 5 mg/dl) und den B6-mt^{AKR} Tieren mit 40 % (174 ± 13 mg/dl vs. 124 ± 5 mg/dl) höher waren als unter Kontrolldiät. Es zeigte sich, dass der Cholesterinspiegel der B6-mt^{FVB} Tiere unter fettreicher Diät niedriger als im Kontrollstamm B6-mt^{AKR} war.

Im Vergleich der beiden Messzeitpunkte zeigte sich bei beiden Stämmen unter fettreicher Diät eine Zunahme des Cholesteringehaltes um 40 %. Dieser Unterschied war bei den B6-mt^{FVB} Tieren signifikant (3 Monate: 156 ± 7 mg/dl vs. 6 Monate: 247 ± 24 mg/dl, $p < 0,05$; ANOVA). Unter Kontrolldiät zeigten sich erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede. (s. Abb. 3.17).

Nach sechs Monaten waren in beiden Stämmen die Cholesterinkonzentrationen unter HFD signifikant höher als unter CD (B6-mt^{FVB}: 247 ± 24 mg/dl vs. 121 ± 3 mg/dl; B6-mt^{AKR}: 245 ± 29 mg/dl vs. 118 ± 6 mg/dl, $p < 0,001$, ANOVA).

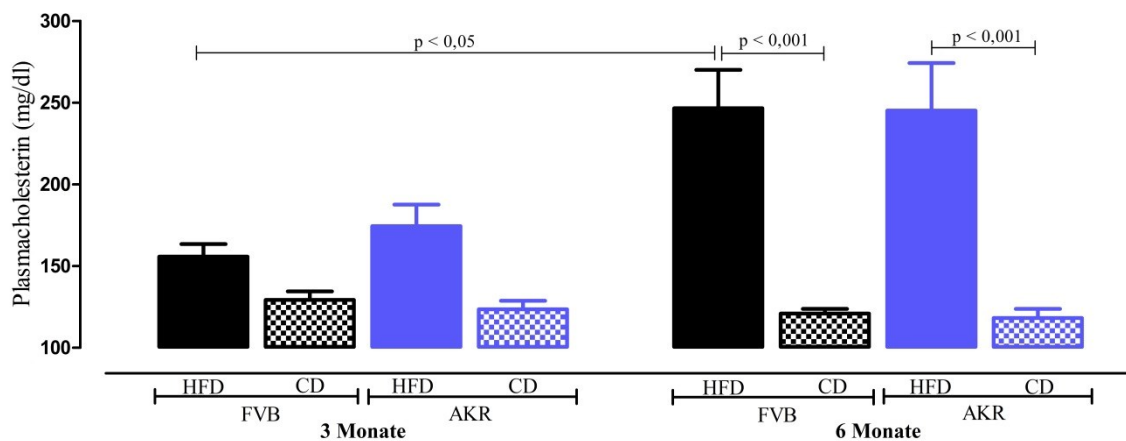


Abb. 3.17 Plasmacholesterinkonzentrationen der Stämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmacholesterinkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD (n = 8 - 12). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt der Plasmacholesterinkonzentration bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In der Betrachtung der Cholesterinspiegel nach dem Geschlecht zeigten sich Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen Tieren.

Weibliche Tiere

In der Gruppe der weiblichen Tiere zeigten sich nach drei Monaten bei beiden Genotypen unter HFD höhere Cholesterinspiegel als unter CD (B6-mt^{AKR} HFD $142,0 \pm 3,8$ mg/dl vs. B6-mt^{AKR} CD $111,4 \pm 1,5$ mg/dl; B6-mt^{FVB} HFD $147,3 \pm 11,5$ mg/dl vs. B6-mt^{FVB} CD $119,0 \pm 3,5$ mg/dl). Im Vergleich der beiden Messzeitpunkte kam es unter HFD zu einer Zunahme des Cholesteringehalts um 20 %. Unter CD zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Nach sechs Monaten lagen in beiden Genotypen unter fettreicher Diät höhere Werte vor als unter Kontrolldiät (80 % bei B6-mt^{FVB}, sowie 70 % bei B6-mt^{AKR}).

Männliche Tiere

In der Gruppe der männlichen Tiere zeigten sich nach drei Monaten innerhalb eines Genotyps unter HFD höhere Cholesterinspiegel als unter CD. Die Cholesterinwerte waren im Stamm B6-mt^{FVB} unter HFD um 30 % niedriger als im Kontrollstamm B6-mt^{AKR}. Unter CD zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen.

Unter HFD kam es zu einer Zunahme der Cholesterinwerte unter HFD, diese war im Stamm B6-mt^{FVB} signifikant (166 ± 12 mg/dl vs. 301 ± 30 mg/dl, $p < 0,05$, ANOVA).

Nach sechs Monaten lagen in beiden Genotypen unter Hochfettdiät signifikant höhere Cholesterinwerte vor als unter Kontrolldiät ($p < 0,001$, ANOVA).

Geschlechtsspezifischer Vergleich

Im Vergleich der Geschlechter untereinander zeigte sich, dass zu beiden Messzeitpunkten die Cholesterinkonzentrationen der männlichen Tiere höher waren als die der weiblichen. Diese Unterschiede lagen bei den B6-mt^{FVB} Tieren nach drei Monaten bei 10 %. Männliche B6-mt^{AKR} zeigten unter CD 20 % höhere Cholesterinkonzentrationen als die weiblichen (139 ± 5 mg/dl vs. 111 ± 1 mg/dl, $p < 0,001$, ANOVA; Abb. 3.18 und 3.19).

Nach sechs Monaten waren die Cholesterinwerte der männlichen Tiere unter HFD in beiden Stämmen signifikant höher als die der weiblichen (B6-mt^{FVB}: 301 ± 30 mg/dl vs. 186 ± 11 mg/dl; B6-mt^{AKR}: 310 ± 44 mg/dl vs. 181 ± 14 mg/dl, 70 %, $p < 0,05$, ANOVA). Unter CD hatten die männlichen Tiere in beiden Stämmen höhere Cholesterinspiegel als die weiblichen, im B6-mt^{AKR} Stamm war dieser Unterschied signifikant (137 ± 2 mg/dl vs. 107 ± 2 mg/dl, $p < 0,001$, ANOVA; s. Abb. 3.18 und 3.19).

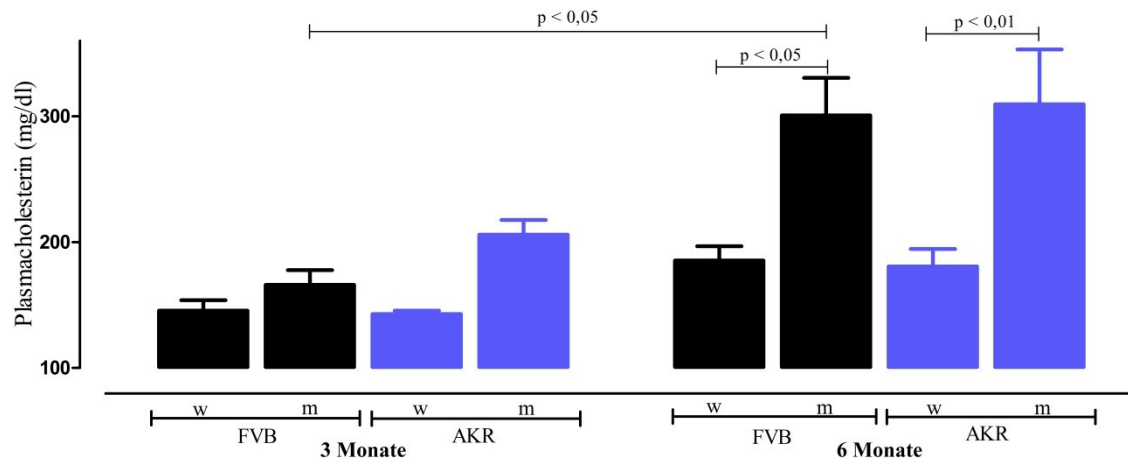


Abb. 3.18 Plasmacholesterinkonzentrationen der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter HFD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmacholesterinkonzentrationen der weiblichen und männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD (n = 4 - 6). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt der Plasmacholesterinkonzentration bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

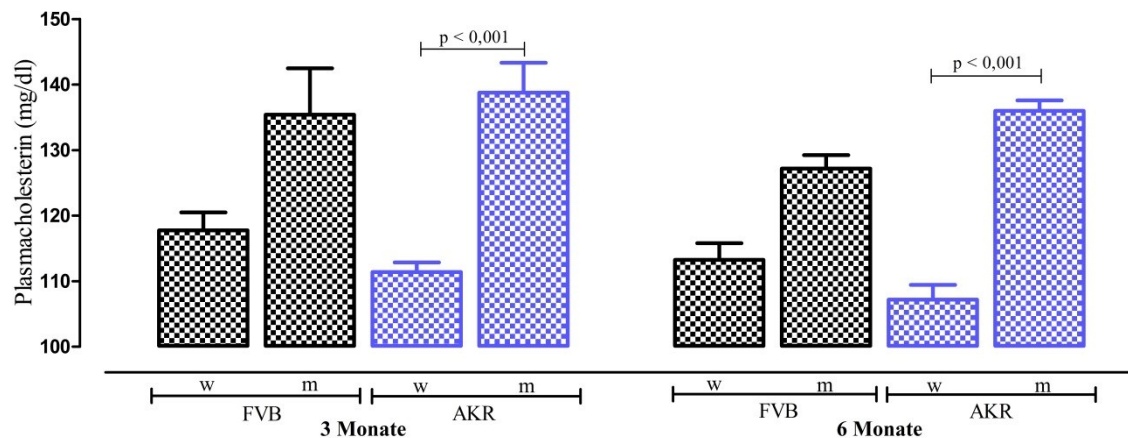


Abb. 3.19 Plasmacholesterinkonzentrationen der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter CD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmacholesterinkonzentrationen der weiblichen und männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter CD (n = 4 - 5). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt der Plasmacholesterinkonzentration bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

3.3.2 Triglyceridkonzentration im Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter fettreicher und Kontrolldiät

Die Triglyceridkonzentrationen im Vollblut der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere wurden, sowohl unter fettreicher als auch Kontrolldiät, nach drei und sechs Monaten Fütterungsdauer bestimmt. Die Auswertung erfolgte auch nach geschlechtsspezifischer Trennung.

Nach drei Monaten war der Triglyceridspiegel bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter HFD signifikant höher (40 %) als unter CD (HFD 196 ± 10 mg/dl vs. CD 142 ± 9 mg/dl, $p < 0,05$, ANOVA). Der Stamm B6-mt^{AKR} zeigte keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 3.20). Unter Hochfettdiät zeigte sich, dass bei den B6-mt^{FVB} Tieren höhere (30 %) Triglyceridkonzentrationen als im Kontrollstamm B6-mt^{AKR} vorlagen (B6-mt^{FVB} 196 ± 10 mg/dl vs. B6-mt^{AKR} 156 ± 6 mg/dl). Unter Kontrolldiät zeigten sich keine Unterschiede. Im Vergleich der beiden Messzeitpunkte zeigten sich bei den B6-mt^{AKR} Tieren unter Hochfettdiät keine signifikanten Veränderungen der Triglyceridspiegel, unter CD kam es hingegen zu einer Abnahme um 20 %. Bei den B6-mt^{FVB} Tieren kam es unter beiden Diäten zu einer Abnahme um 15 % (s. Abb. 3.20).

Nach sechs Monaten waren die Triglyceridkonzentrationen innerhalb eines Genotyps wie erwartet unter HFD höher als unter CD und war in beiden Stämmen signifikant (B6-mt^{FVB}: 175 ± 12 mg/dl vs. 116 ± 9 mg/dl, $p < 0,001$, ANOVA; B6-mt^{AKR}: 162 ± 10 mg/dl vs. 116 ± 4 mg/dl, $p < 0,05$, ANOVA; s. Abb. 3.20). Zwischen den beiden Genotypen gab es keine signifikanten Unterschiede.

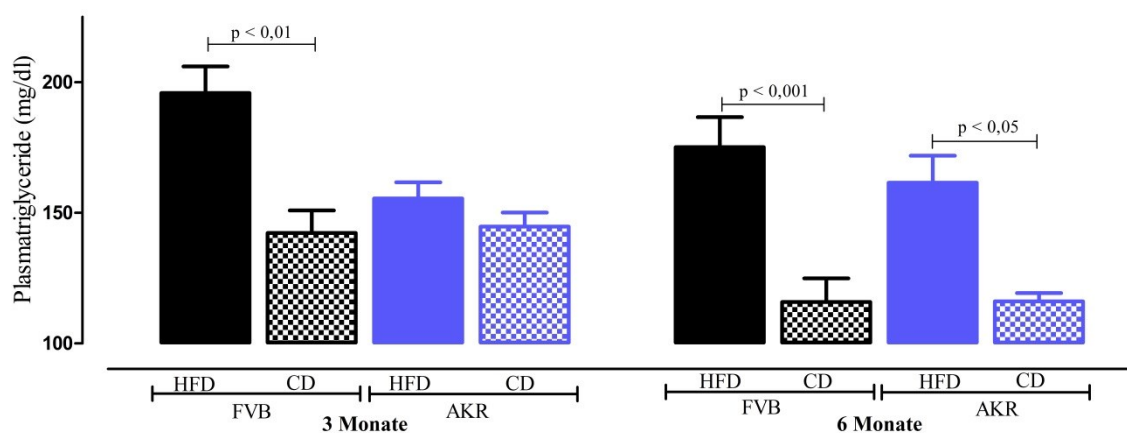


Abb. 3.20 Plasmatriglyceridkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter HFD und CD

Die Abbildung zeigt die Plasmatriglyceridkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 8 - 12$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt der Plasmatriglyceride bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In der Betrachtung der Triglyceridspiegel nach dem Geschlecht zeigten sich Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen Tieren.

Weibliche Tiere

In der Gruppe der weiblichen Tiere lagen nach drei Monaten innerhalb eines Genotyps unter HFD bei den B6-mt^{FVB} Tieren 20 % höhere Werte vor als unter CD. Bei den B6-mt^{AKR} Weibchen gab es keine Unterschiede zwischen den Diäten. Unter Hochfettdiät waren die Triglyceridwerte bei den B6-mt^{FVB} Weibchen 30 % höher als im Kontrollstamm B6-mt^{AKR}. Unter Kontrolldiät gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen (s. Abb. 3.21 und 3.22).

Nach sechs Monaten waren die Triglyceridspiegel bei beiden Genotypen unter HFD 30 % höher als unter CD. Zwischen den beiden Genotypen gab es für beide Diäten keine signifikanten Unterschiede.

Männliche Tiere

In der Gruppe der männlichen Tiere waren nach drei Monaten unter HFD bei den B6-mt^{FVB} Tieren 40 % und den B6-mt^{AKR} Tieren 10 % höhere Werte als unter CD messbar. Dieser Unterschied war bei den B6-mt^{FVB} Tieren signifikant. Unter Hochfettdiät zeigten sich bei den B6-mt^{FVB} Tieren 20 % höhere Triglyceridkonzentrationen als bei den B6-mt^{AKR} Tieren, unter CD waren sie 10 % niedriger.

Im Vergleich der beiden Messzeitpunkte zeigte sich bei den B6-mt^{AKR} Tieren unter Kontrolldiät eine Abnahme der Triglyceridgehalte um 20 % und bei den B6-mt^{FVB} Tieren um 10 %.

Geschlechtsspezifischer Vergleich

Im Vergleich der Geschlechter untereinander zeigte sich nach drei Monaten, dass nur im Stamm B6-mt^{AKR} unter Hochfettdiät die männlichen Tiere höhere (15 %) Triglyceridwerte hatten als die weiblichen. Unter CD zeigten die weiblichen Tiere im Stamm B6-mt^{AKR} keine signifikanten Unterschiede zu den männlichen. Bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter HFD lagen die Werte der weiblichen Tiere etwa gleich hoch mit den männlichen, unter CD zeigten die Weibchen um 10 % höhere Triglyceridkonzentrationen.

Nach sechs Monaten war der Trend zu erkennen, dass die weiblichen Tiere unter beiden Diäten höhere Triglyceridkonzentrationen im Plasma hatten als die männlichen (s. Abb. 3.21 und 3.22).

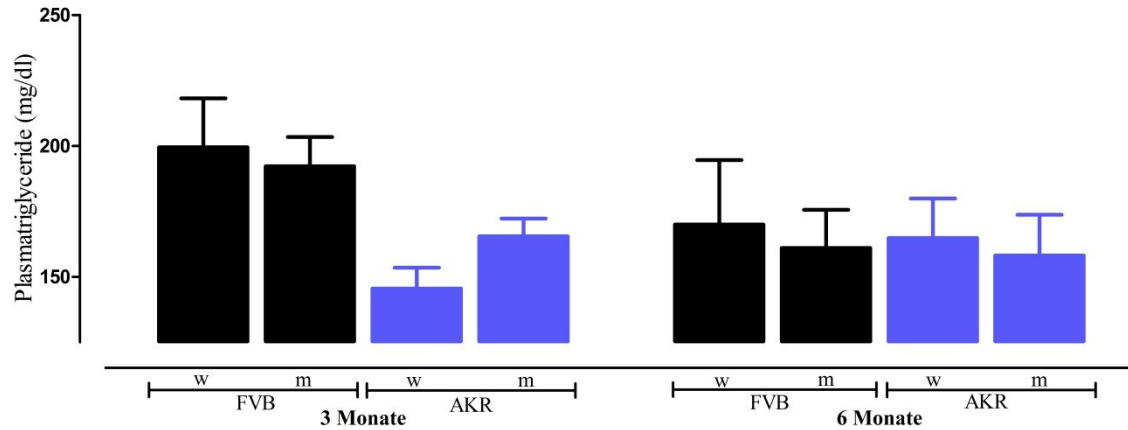


Abb. 3.21 Plasmatriglyceridkonzentrationen der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter HFD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmatriglyceridkonzentrationen der weiblichen und männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD (n = 4 - 8). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt Plasmatriglyceriden bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

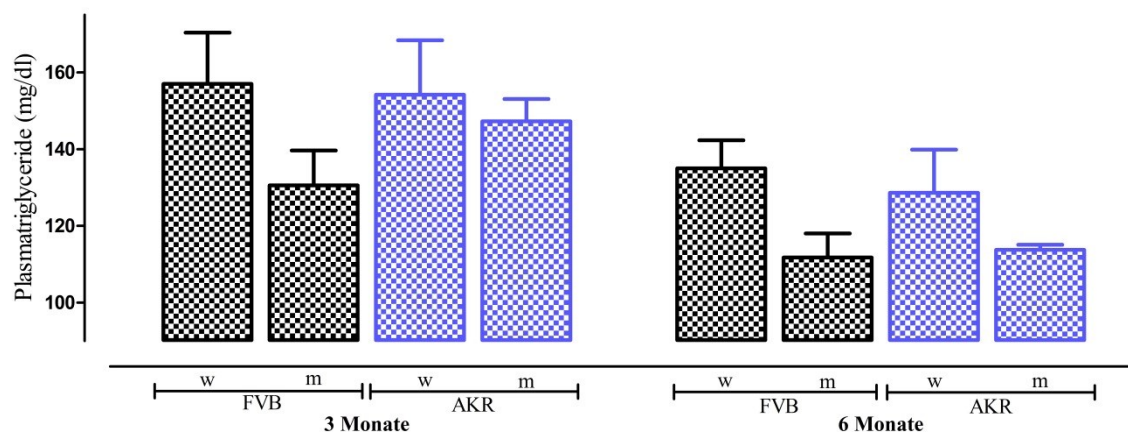


Abb. 3.22 Plasmatriglyceridkonzentration der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere unter CD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die Plasmatriglyceridkonzentrationen der weiblichen und männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere nach drei und sechs Monaten unter CD (n = 4 - 5). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt an hepatischen Triglyceriden bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

3.3.3 Triglyceridkonzentration der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere in der Leber

Die Triglyceridkonzentrationen der Leber wurden jeweils pro 1 mg Protein nach drei und sechs Monaten Fütterungsdauer bestimmt. Somit konnte geschaut werden, welche Auswirkung die Diät und der Stamm auf die Fettakkumulation in der Leber haben. Hierfür wurden zusätzlich die weiblichen und männlichen Tiere einzeln betrachtet.

Nach drei Monaten zeigten sich bei beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Diäten. Unter HFD hatten die B6-mt^{FVB} Tiere signifikant mehr (über 75 %) Triglyceride in der Leber eingelagert als der B6-mt^{AKR} Stamm ($751 \pm 93 \mu\text{g}$ vs. $421 \pm 69 \mu\text{g}$, $p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.23). Unter CD waren die Triglyceridkonzentrationen bei den B6-mt^{FVB} Tieren nahezu 50 % höher als in dem Kontrollstamm B6-mt^{AKR} ($750 \pm 48 \mu\text{g}$ vs. $480 \pm 58 \mu\text{g}$, $p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.23).

Im Vergleich der beiden Messzeitpunkte zeigte sich eine weitere Triglycerideinlagerung in der Leber bei den B6-mt^{AKR} Tieren unter HFD um $218 \mu\text{g}$ und bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter CD um $87 \mu\text{g}$. Unter HFD bei den B6-mt^{FVB} Tieren und unter CD bei den B6-mt^{AKR} Tieren zeigte sich keine signifikante Veränderung.

Nach sechs Monaten waren die Triglyceridkonzentrationen im Stamm B6-mt^{FVB} unter CD höher als unter HFD, bei den B6-mt^{AKR} Tieren lag unter CD der Triglyceridspiegel in der Leber etwa $140 \mu\text{g}$ niedriger als unter HFD (s. Abb. 3.23). Unter CD hatten die B6-mt^{FVB} Tiere signifikant nahezu 75 % mehr Triglyceride in der Leber gespeichert als die B6-mt^{AKR} Tiere ($837 \pm 63 \mu\text{g}$ vs. $495 \pm 76 \mu\text{g}$; $p < 0,05$, ANOVA, s. Abb. 3.23).

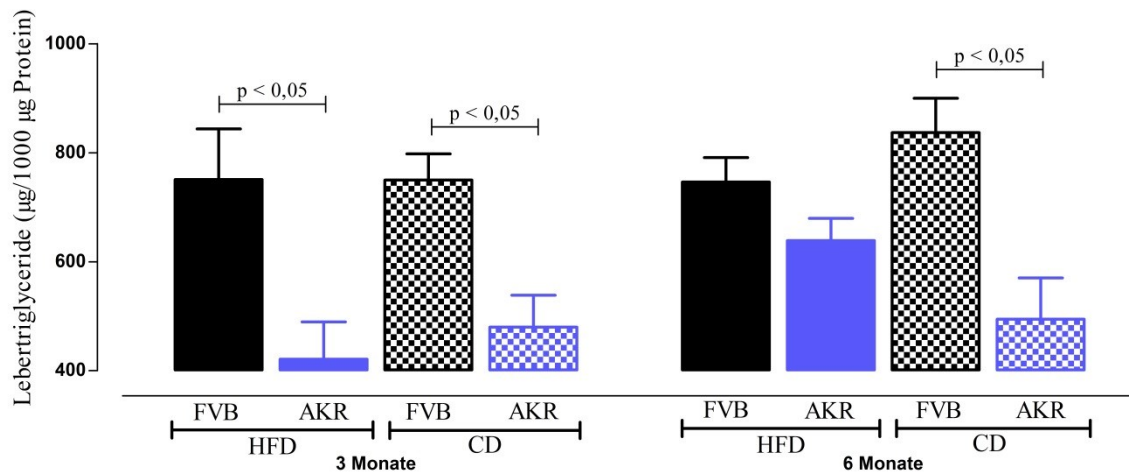


Abb. 3.23 Triglyceridkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere in der Leber unter HFD und CD nach 3 und 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die intrahepatischen Triglyceridkonzentrationen der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere in der Leber nach drei und sechs Monaten unter HFD und CD (n = 6 - 9). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt an hepatischen Triglyceriden bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

In der Betrachtung nach dem Geschlecht zeigten sich Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen Tieren.

In der Gruppe der weiblichen Tiere waren nach drei Monaten die Triglyceridgehalte im Stamm B6-mt^{FVB} unter beiden Diäten 10 % höher als im Kontrollstamm. Die B6-mt^{FVB} Weibchen zeigten unter HFD etwa 50 % niedrigere Triglyceridspiegel in der Leber als unter Kontrolldiät. Der Kontrollstamm B6-mt^{AKR} wies unter HFD 15 % weniger hepatische Triglyceride auf als unter CD (n.s.).

In der Gruppe der männlichen Tiere ließen sich unter fettreicher Diät keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen feststellen. Unter CD hingegen zeigte der B6-mt^{FVB} Stamm 35 % höhere Triglyceridspiegel in der Leber als der Kontrollstamm B6-mt^{AKR} ($831 \pm 54 \mu\text{g}$ vs. $605 \pm 67 \mu\text{g}$, n.s.). Bei den B6-mt^{FVB} Männchen waren unter Hochfettdiät die Triglyceridkonzentrationen etwa 10 % und bei den B6-mt^{AKR} Männchen fast 50 % höher als

unter Kontrolldiät (n.s.). Da die Männchen mehr Fett in die Leber einlagerten als die Weibchen, was bei den B6-mt^{FVB} Tieren Diät unabhängiger erfolgte, ergaben sich folgende geschlechtsspezifische Unterschiede:

Nach drei Monaten HFD lagerten die Männchen mehr als doppelt so viel Lipide in die Leber ein wie die Weibchen (B6-mt^{FVB}: $859 \pm 77 \mu\text{g}$ vs. $405 \pm 71 \mu\text{g}$; B6-mt^{AKR}: $880 \pm 71 \mu\text{g}$ vs. $367 \pm 52 \mu\text{g}$, $p < 0,001$, ANOVA; s. Abb. 3.24).

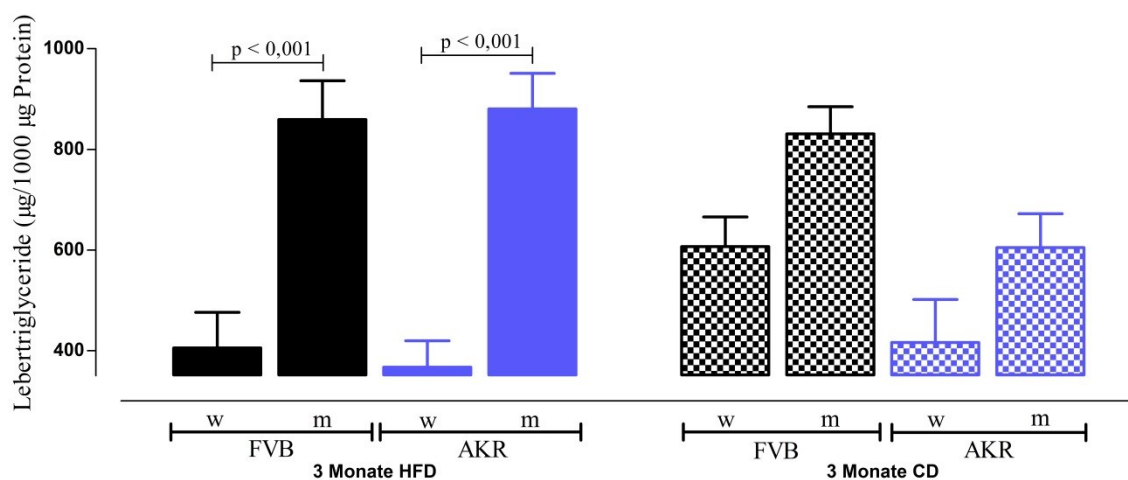


Abb. 3.24 Triglyceridkonzentrationen der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere in der Leber unter HFD und CD nach 3 Monaten

Die Abbildung zeigt die intrahepatischen Triglyceridkonzentrationen der weiblichen und männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere in der Leber nach drei Monaten unter HFD und CD ($n = 4 - 5$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt an hepatischen Triglyceriden bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Im Vergleich der beiden Messzeitpunkte zeigten sich bei den B6-mt^{AKR} Weibchen unter CD keine signifikanten Veränderungen, unter HFD kam es zu einer signifikanten Zunahme intrahepatischer Lipide um 35 % ($367 \pm 52 \mu\text{g}$ vs. $572 \pm 21 \mu\text{g}$; $p < 0,05$, ANOVA). Bei den B6-mt^{FVB} Weibchen kam es unter HFD zu einer Zunahme um 50 %, unter CD zu einer Abnahme um 10 %.

Bei den Männchen zeigten sich im Vergleich der beiden Messzeitpunkte in beiden Stämmen unter HFD und im B6-mt^{FVB} Stamm unter CD keine signifikanten Veränderungen. Unter CD kam es bei den B6-mt^{AKR} Tieren zu einer Zunahme der Triglyceridgehalte der Leber um 30 % (n.s.).

Nach sechs Monaten waren die Triglyceridkonzentrationen im Kontrollstamm der Weibchen unter fettreicher Diät 50 % höher als unter CD ($572 \pm 21 \mu\text{g}$ vs. $349 \pm 53 \mu\text{g}$, n.s.). Unter Hochfettdiät zeigten sich zwischen beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede, unter CD hatten die B6-mt^{FVB} Weibchen höhere (50 %) Triglyceridspiegel als der Kontrollstamm ($541 \pm 67 \mu\text{g}$ vs. $349 \pm 53 \mu\text{g}$, n.s.; s. Abb. 3.25).

Bei den Männchen waren nach sechs Monaten die Triglyceridwerte in beiden Stämmen unter fettreicher Diät nahezu gleich.

Im Vergleich der Geschlechter untereinander zeigte sich nach sechs Monaten der Trend, dass männliche Tiere unter beiden Diäten mehr intrahepatische Lipide einlagerten als die weiblichen. Unter CD lagerten die Männchen in beiden Genotypen signifikant mehr Triglyceride in der Leber ein als die Weibchen (B6-mt^{FVB}: $855 \pm 74 \mu\text{g}$ vs. $541 \pm 67 \mu\text{g}$, $p < 0,05$, ANOVA; B6-mt^{AKR}: $781 \pm 36 \mu\text{g}$ vs. $349 \pm 53 \mu\text{g}$, $p < 0,01$, ANOVA; s. Abb. 3.25).

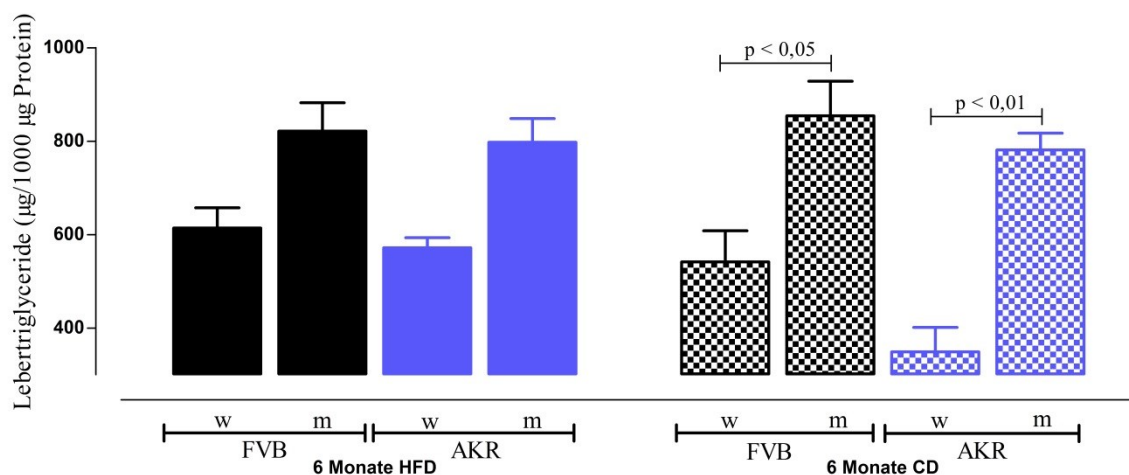


Abb. 3.25 Triglyceridkonzentration der weiblichen (w) und männlichen (m) B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere in der Leber unter HFD und CD nach 6 Monaten

Die Abbildung zeigt die intrahepatischen Triglyceridkonzentrationen der weiblichen und männlichen B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Tiere in der Leber nach sechs Monaten unter HFD und CD ($n = 4 - 5$). Alle Tiere erhielten während der Studiendauer die Diät ad libitum. Es wurde der Durchschnittsgehalt an hepatischen Triglyceriden bestimmt; angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Der Wildtyp (AKR) und CD wurden als Referenz für die Mutante (FVB) und HFD genutzt. Bei dem unabhängigen Versuch wurde die statistische Auswertung mit einem ANOVA und Bonferroni Post-Test durchgeführt.

4 Diskussion

Mitochondrien sind als Zellorganellen notwendig für den Metabolismus der Glucose und Lipide (Fex et al 2007). Bei ihrem Stoffwechsel kommt es zur Bildung von ATP, welches über die Oxidative Phosphorylierung und im letzten Schritt durch die ATP-Synthase synthetisiert wird. Funktionelle Untereinheit der ATP-Synthase ist die *Atp8*-Untereinheit, durch die eine korrekte Assemblierung und Funktionsweise ermöglicht wird (Stock et al 2000). Ein Defizit in diesem System geht mit Störungen im Metabolismus und ferner mit der Ausbildung von Erkrankungen wie des T2DM oder metabolischen Symptomkomplexen einher (Reaven 1993).

Als Trigger für eine effiziente ATP-Produktion ist die Glucose zu werten. Dieses Substrat führt über die ATP-Bildung zur Insulinsekretion, um erhöhte Blutglucoselevel zu senken. Die Höhe der Blutglucose reguliert die Menge des sezernierten Insulins, weshalb dieser Mechanismus als Glucose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) bezeichnet wird (Mueckler and Thorens 2013). Neben der Glucose führen aber auch Lipide, insbesondere im Rahmen der β -Oxidation, zu einer gesteigerten Insulinsekretion der β -Zellen (Roduit et al 2004). Ein gesteigerter Insulinbedarf kann insbesondere durch eine Zunahme der β -Zellmasse kompensiert werden (Kubota et al 2000). Das OXPHOS-System produziert neben dem ATP aber auch schädigende ROS (Smeitink et al 2006). Sind die Stimulationsreize dauerhaft vorhanden oder erhöht, wie unter einer HFD, führt das zu einer Dekompensation des regulierenden Systems. Gleichzeitig nimmt die Körpermasse durch Vermehrung der Adipozytenzahl zu. Adipozyten haben jedoch auch eine regulatorische Funktion, die sie durch die Sekretion des Leptins ermöglichen (Zhang et al 2002b). Das Leptin wirkt als Gegenspieler des Insulin und nimmt u.a. Einfluss auf hämatopoietischer Ebene. Das Ausmaß einer Störung dieses Systems wird auch durch die Ausbildung von Dyslipidämien und einer Fettleber (steatosis hepatis) ersichtlich (Hirosumi et al 2002; Reaven 1988).

Es wird deutlich, dass Störungen der ATP-Synthase, wie durch das *mt-Atp8*-Gen entstanden, zu Adaptationsvorgängen und Kompensationsmechanismen führen. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss des *mt-Atp8*-Gens in Verbindung mit einer metabolischen Belastung (HFD) auf metabolische Adaptationen und Kompensationen untersucht. Die erwähnten beeinflussten Faktoren werden im Folgenden einzeln und im gegenseitigen Einfluss betrachtet.

4.1 Auswirkung der *mt-Atp8*-Genvariante auf die Adaptation metabolischer Parameter des Metabolischen Syndroms der C57BL/6J-Maus

Der in dieser Arbeit genutzte Hintergrundstamm C57BL/6J im Mausmodell gilt als geeigneter Stamm bei der Untersuchung des Metabolischen Syndroms bzw. metabolischer Störungen. Unter HFD entwickelt er eine Adipositas, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Hypertonie, bleibt jedoch unter CD physiologisch unauffällig (Surwit et al 1988). Eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Adipositas und eines T2DM spielt das viszerale Fettgewebe (Rebuffe-Scrive et al 1993; Surwit et al 1995). Es wurde mehrfach gezeigt, dass dieses bei B6-Mäusen nicht aufgrund einer Hyperphagie entsteht, sondern wegen der höheren Gewichtszunahme pro kcal (Brownlow et al 1996; Parekh et al 1998; Surwit et al 1995). In der vorliegenden Arbeit entwickelten beide Genotypen unter HFD eine starke Gewichtszunahme. Es konnte somit vermutet werden, dass der Hintergrundstamm ‚B6‘ per se für eine schnellere Ausbildung einer Adipositas unter metabolischem Stress prädisponiert. Von Interesse war es herauszufinden, wie der jeweilige Genotyp auf die metabolische Belastung reagiert und welchen Einfluss die mitochondriale Mutation bei der Kompensation der metabolischen Belastung in Bezug auf die Fettmasse und den Lipidstoffwechsel nimmt.

Durch eine konsequente HFD steigt der Anteil intrazellulärer Lipide unter anderem in den β -Zellen des Pankreas (Fex et al 2007). Hier erfolgt der Abbau über die β -Oxidation der Fettsäuren, bei dem Reduktionsäquivalente (FADH_2 und $\text{NADH} + \text{H}^+$) entstehen. Diese werden über die Atmungskette unter Erhöhung des elektrochemischen Gradienten reoxidiert. Durch diese Anforderung an die Effizienz der Atmungskette entwickelt sich ein höheres Membranpotenzial, was zugleich in einem Anstieg von mitochondrialem ROS (Wu et al 2013) resultiert, die die mitochondriale Aktivität negativ beeinflussen (Wu et al 2013). Dieser Einfluss zeigt sich durch vermehrte mtDNA-Mutationen, ausgeprägten Defekten der Atmungskette und ein folglich weiterer Anstieg von ROS und Lipidperoxiden in den Mitochondrien (Ma et al 2009; Wu et al 2010). Die B6-mt^{FVB} Maus zeigt bereits ohne eine Lipidbelastung eine verstärkte ROS-Produktion (Weiss et al 2012). Somit ist anzunehmen, dass eine zusätzlich schädigende HFD, die eine verstärkte Atmungskettenaktivität induziert (Facundo et al 2007), zu einer potenzierten Bildung von ROS führt. So würden Mitochondrien dieses Genotyps frühzeitiger und schneller geschädigt und eine Lipidbelastung könnte nicht hinreichend kompensiert werden. Da sich jedoch bei der B6-mt^{FVB} Maus im Vergleich zur B6-mt^{AKR} Maus für die Blutlipidparameter ein eher besserer metabolischer Status mit einer

Kompensationsfähigkeit zeigte, sind schützende intrazelluläre und mitochondriale Prozesse zu vermuten, die im Folgenden gezeigt werden.

4.1.1 Der Lipidmetabolismus der B6-Maus und der Einfluss des *mt-Atp8*-Gens

Für den Lipidmetabolismus konnte bereits gezeigt werden, dass der Hintergrundstamm B6 und der AKR/J-Stamm physiologisch geringere Mengen Plasmatriglyceride und Plasmacholesterin im Vergleich zur FVB-Maus aufweisen (Jiao et al 1990). Unter HFD entwickelt der B6-Stamm leicht eine Dyslipidämie mit erhöhten Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma (Lu et al 2013). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für die B6-*mt*^{FVB} und B6-*mt*^{AKR} Maus unter HFD signifikant höhere Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen. Es fiel auf, dass Tiere mit der Mutation des *mt-Atp8*-Gens im Vergleich zum Kontrollstamm unter HFD niedrigere Cholesteringehalte hatten, diese waren jedoch nicht signifikant. Der Triglyceridgehalt war nach drei Monaten signifikant höher, nach sechs Monaten zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen.

Für den Lipidmetabolismus spielen sowohl die Aufnahme als auch Oxidation kohlenhydrat- und lipidreicher Substrate in den Mitochondrien eine Rolle (Stephenson and Hawley 2013). Da die aufgenommene Nahrungsmenge nicht erhöht ist (Brownlow et al 1996; Surwit et al 1995), scheint eine beeinflusste Substratoxidation in den Mitochondrien für die Veränderung der Blutlipidparameter mitverantwortlich zu sein. Die Arbeitsgruppe um Galgani zeigte für insulinresistente Muskeln, dass unter diesen Bedingungen die mitochondriale Fähigkeit zwischen Glucose und Lipiden zu unterscheiden sinkt und beschreibt diesen Zustand als ‚metabolische Inflexibilität‘ (Galgani et al 2008). Dieser führt zu einer Fehlregulation der Lipidoxidation, die unabhängig von der aufgenommenen Nahrung erfolgt (Kelley and Simoneau 1994). Dadurch steigt die intrazelluläre Akkumulation von Triglyceriden (McGarry 2002). Wilke et al. fanden heraus, dass bei bestehendem T2DM respektive der Abnahme der Insulinsensitivität die Lipogenese bereits unter geringer Energieaufnahme gesteigert ist, was zum Anstieg der Triglyceride führt (Wilke et al 2009). Diese Aussage wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Unter HFD stiegen die Triglyceridkonzentrationen und die Tiere reagierten mit einer gestörten Glucosetoleranz und Insulinsensitivität, insbesondere die Tiere mit der *mt-Atp8*-Mutation. Tiere dieser mitochondrialen Genvariante verminderten zwischen drei und sechs Monaten ihre

Plasmatriglyceridspiegel, was auf einen Kompensationsmechanismus in Form einer verstärkten Fettsäureoxidation hindeuten kann. Vercesi et al. erklärten diese Kompensation als einen ‚hypermetabolischen Status in hyperlipidämischen Tieren‘ (Vercesi et al 2007). Eine verstärkte Lipidoxidation, die bekannter Weise mit einer verstärkten ROS-Produktion einhergeht, ermöglicht dadurch zugleich ein mildes Entkoppeln der Atmungskette. Dabei induzieren gebildete ROS mitochondriale K_{ATP} -Kanäle, sodass der folgende KaliumEinstrom in den Matrixraum eine K^+/H^+ -Pumpe aktiviert, die im Austausch gegen Kalium Protonen in den Matrixraum schleust (Facundo et al 2007). Durch die Abnahme der Protonenzahl im Matrixraum wird die ROS-Produktion gesenkt und zugleich die metabolische Rate erhöht. Da nur die B6- mt^{FVB} Maus, mit einer generell erhöhten ROS-Produktion, ihren primär signifikant höheren Triglyceridspiegel von drei nach sechs Monaten senken konnte, scheint die *mt-Atp8*-Genvariante unter höherer metabolischer Belastung einen gewissen Vorteil gegenüber der B6- mt^{AKR} Maus zu haben. Durch die erhöhte Produktion toxischen ROS gelingt es zugleich eine zusätzliche Schädigung durch Lipidintermediate zu kompensieren.

4.1.2 Der Einfluss des *mt-Atp8*-Gens auf den Cholesterinspiegel der B6-Maus

Bekannt ist, dass die endogene Cholesterinsynthese sowohl von der enteralen Resorption des Cholesterins aus der Nahrung, dem zellulärem Export als auch dem bestehenden Cholesterinspiegel kontrolliert wird (Li et al 2013). Die intestinale Resorption des Cholesterins zeigt Unterschiede zwischen den Genotypen. Der Mausstamm AKR absorbiert < 25 %, der FVB-Stamm etwa 35 % und der B6-Stamm etwa 40 % des Nahrungscholesterins (Wang et al 2001). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von Carter et al., die vergleichbar hohe Absorptionsraten der AKR/J und B6-Maus zeigten (Carter et al 1997). Nach Übertragung der mtDNA der AKR/J und FVB-Maus auf den Hintergrundstamm B6, wie in der vorliegenden Arbeit, wurden für beide Genotypen vergleichbare Blutlipidparameter gemessen. Es scheint also der Einfluss der mtDNA auf metabolische Belastungen stärker zu sein als der nDNA.

Unter der HFD wurden signifikant höhere Plasmacholesterinkonzentrationen beider Stämme im Vergleich zur CD detektiert, was auf eine gesteigerte Resorptionsrate hinweisen kann. Da die B6- mt^{FVB} Maus unter HFD eine geringere Plasmacholesterinkonzentration als der

B6-mt^{AKR} Stamm entwickelte, scheint die *mt-Atp8*-Genvariante einen positiven Einfluss bei der Cholesterinaufnahme respektive im Cholesterinmetabolismus zu haben.

Für die zelluläre Aufnahme und Abtransport des Cholesterins spielen ATP-bindende Transporter („ATP-binding cassette“, ABC) eine Rolle, von denen das menschliche Genom über 48 individuelle Formen verfügt (Dean et al 2001). Durch das Binden von ATP entsteht Energie, die für den Transport durch Plasmamembranen und intrazellulärer Membranen wie z.B. des Mitochondriums genutzt wird (Higgins 1992). Unter anderem in β -Zellen existieren die Transporter und regulieren den Cholesterinexport (Yin et al 2010). Eine Inhibition des Transporters führt zu intrazellulärer Cholesterinakkumulation und unterstützt eine β -Zelldysfunktion (Brunham et al 2007). Es zeigt sich eine direkte Verbindung zwischen dem Cholesterinmetabolismus und der ATP-Synthase, da ATP die Funktion der ABC-Transporter steuert (Higgins 1992). Bei den B6-mt^{FVB} Mäusen wurde in den pankreatischen Inseln niedrigere ATP-Mengen gemessen (Weiss et al 2012). Der bei der B6-mt^{FVB} Maus unter HFD niedrigere Cholesterinspiegel kann somit auf einen beeinträchtigten Abtransport intrazellulären Cholesterins zurückzuführen sein, der durch Inhibition der ABCA1 Transporter aufgrund inadäquater ATP-Synthese erklärbar wäre. Die verminderte ATP-Synthaseleistung der B6-mt^{FVB} Maus führt vermutlich dazu, dass durch weniger verfügbares ATP die ABC-Transporter negativ beeinflusst werden, wodurch intrazelluläres Cholesterin steigt und durch verminderten Export die Plasmaspiegel sinken.

Die auch in der vorliegenden Arbeit detektierten signifikant niedrigeren Cholesterinspiegel der Weibchen im Vergleich zu den Männchen, wurde bereits früher in Mausstämmen gemessen (Weibust 1973). Der Grund hierfür wird in der bei den Weibchen höheren Östrogenproduktion vermutet, wodurch der Cholesterinspiegel gesenkt werden kann.

4.2 Adaptation des Insulinspiegels unter dem Einfluss des *mt-Atp8*-Gens

Für die Seruminsulinspiegel konnte gezeigt werden, dass die B6-mt^{FVB} Mäuse zu beiden Zeitpunkten unter CD und nach sechs Monaten unter HFD einen niedrigeren Insulingehalt als die B6-mt^{AKR} Mäuse hatten. Die B6-mt^{FVB} Tiere zeigten dabei eine Diätabhängigkeit, die bei den B6-mt^{AKR} Tieren nicht vorlag.

Der Seruminsulinspiegel steht in enger Verbindung mit der Insulinsensitivität und Insulinresistenz (Bruning et al 1997). Eine verminderte Insulinsensitivität, begleitet von einer erhöhten Insulinresistenz, geht mit einer kompensatorisch erhöhten Insulinproduktion der β -Zellen einher, um eine mögliche Hyperglykämie abzuwenden (Parsons et al 1992). Kann die zunächst entstandene reaktive Hyperinsulinämie eine Hyperglykämie nicht mehr kompensieren, resultiert das Vollbild des Diabetes mellitus (Martin et al 1992; Reaven 1993).

Nahrungskarenz bzw. der Konsum von normokalorischen Substanzen ist im Gegensatz dazu protektiv in Bezug auf eine Insulinresistenz (Speakman and Mitchell 2011). Das lässt sich für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausstämme zeigen. Der unter CD geringere Seruminsulingehalt lässt eine höhere periphere Insulinsensitivität bei geringerem Insulinbedarf und folglich noch keine Insulinresistenz annehmen. Im Blick auf die B6- mt^{FVB} Tiere, die im Vergleich zu den B6- mt^{AKR} Tieren eine geringere Gewichtszunahme entwickelten, würde dieser Pathomechanismus eine eher verbesserte mitochondriale Effizienz bedeuten. Dafür sprechen die bei diesem Genotyp detektierten geringeren Seruminsulinkonzentrationen unter CD gegenüber dem B6- mt^{AKR} Stamm.

Für eine effektive Insulinsekretion benötigt die β -Zelle ATP, welches über die Atmungskette beim Abbau der Glucose bereitgestellt wird. Die Höhe des Glucosespiegels reguliert die Höhe der Insulinsekretion, weshalb dieser Mechanismus als GSIS bezeichnet wird (Mueckler and Thorens 2013). In Mausmodellen mit B6-Mäusen konnte gezeigt werden, dass auch eine HFD über den Abbau der Lipide zu einer kompensatorischen Hyperinsulinämie führt (Gonzalez et al 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Phänomen bestätigt werden. Beide Mausstämme hatten unter HFD erhöhte Seruminsulinspiegel. Hierbei zeigte der mutierte Phänotyp zunächst deutlich höhere Insulinspiegel als der Kontrollstamm. Das lässt die Vermutung zu, dass bei den B6- mt^{FVB} Tieren die Insulinsekretionsrate höher oder die Insulinsensitivität der peripheren Organe schneller und intensiver herabgesetzt ist (Weiss et al 2012). Beides würde eine stärkere, evtl. kompensatorische, Insulinsekretion erklären.

Die Arbeitsgruppe um Weiss et al. konnte in einer aktuellen Studie zur Insulinsensitivität und -produktion zur Mutation im *mt-Atp8*-Gen zeigen, dass nach drei Monaten Fütterungszeit die Insulinkonzentrationen der B6- mt^{FVB} Tiere unter HFD signifikant höher und unter CD signifikant geringer als bei den B6- mt^{AKR} Tieren ist. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Im Gegensatz zur genannten Studie, wurden in der vorliegenden Arbeit beide Stämme über einen Zeitraum von sechs Monaten betrachtet und der Seruminsulingehalt bestimmt. Zum zweiten Messzeitpunkt sank bei den B6- mt^{FVB} Tieren

unter HFD der Seruminsulingehalt, was eine eingeschränkte Adaptation dieses Genotyps an die metabolische Belastung vermuten lässt. Möglicherweise bestehen parallel schädigende Einflüsse wie ROS, die die mtDNA der β -Zellen schädigen und damit die Insulinproduktions- und -sekretionsrate senken.

Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in einem verminderten ATP-Status. Die ATP-Synthase-Leistung ist dabei das Produkt suffizienter Mitochondrien. Die Arbeitsgruppe um Pintus zeigte einen pathologischen Weg, der über eine durch Ernährung entstehende Imbalance zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt. So beschrieben Pintus et al., dass es bei vermehrter Adipozytenzahl zu reduzierten Level der Proteine ‚peroxisome proliferative activated receptor- γ coactivator 1 α ‘ und ‚dynamin-related GTPases mitofusin 2‘ kommt. Dadurch nimmt die Mitochondrienzahl ab, der mitochondriale Sauerstoffverbrauch und Elektrochemische Gradient werden vermindert und konsekutiv wird vermindert ATP synthetisiert (Bach et al 2003). Eine Zunahme des Fettgewebes würde in einer reduzierten mitochondrialen Energieeffizienz aufgrund Hemmung der Oxidativen Phosphorylierung und herabgesetzter ATP-Synthase wie in apoptotischen Zellen resultieren (Bach et al 2005; Kelley et al 2002). Weiss et al. zeigten zu dem, dass die pankreatischen Inseln der B6-mt^{FVB} Tiere über niedrigere ATP-Level verfügten (Weiss et al 2012). Die Arbeitsgruppe um Jonckheere konnte für eine weitere *mt-Atp8*-Mutation eine verminderte ATP-Synthase-Leistung nachweisen (Jonckheere et al 2009). Es ist eine Fehlsteuerung der Atmungskettenkomplexe, insbesondere der durch das *mt-Atp8-Gen* veränderten ATP-Synthese, anzunehmen. Diese Vorgänge sind Ausgang für die Bildung metabolischer Syndrome wie Insulinresistenz und einer Steatosis hepatis (Park et al 2012; Pintus et al 2012). Für die B6-mt^{FVB} Maus würden diese Prozesse zu einer Potenzierung der ungenügenden ATP-Produktion führen. Da folglich der Trigger zur Insulinsekretion vermindert vorhanden ist, könnte das die bei diesem Stamm unter CD im Vergleich zum Kontrollstamm niedrigeren Insulinkonzentrationen miterklären. Zusammen mit dem Ergebnis, dass dieser Stamm für eine verstärkte ROS-Produktion konditioniert (Weiss et al 2012), könnten auch die gemessenen niedrigeren Seruminsulinspiegel nach sechs Monaten unter HFD erklärt werden.

Die Insulinsekretion ist neben der Glucose und Lipide auch durch weitere Faktoren beeinflusst. Die β -Zellfunktion des Pankreas scheint dabei unter dem Einfluss sogenannter ‚uncoupling proteins‘ (UCP) zu stehen (Krauss et al 2005; Liu et al 2013). Von den insgesamt fünf UCP spielt das UCP2 eine Rolle im Glucose- und Lipidstoffwechsel (Diano and Horvath 2012), indem es die mitochondriale Aufnahme des Pyruvat, damit den Glucosestoffwechsel

inhibiert (Trennung der ATP-Synthese von Glucose) und zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation führt (Emre and Nubel 2010). Erhöhte Glucose- und Lipidlevel induzieren die UCP2 Gen- und Proteinexpression. Da das UCP2 den Glucosestoffwechsel inhibiert, führt das zu bleibenden erhöhten Blutglucosespiegeln, und bedingt, dass die GSIS beeinträchtigt wird. Durch diese Modulation kommt es nach primärer Hyperinsulinämie zu einer späteren Hemmung der Insulinproduktion und zur pankreatischen β -Zelldysfunktion (Krauss et al 2003). Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde nicht der Einfluss der UCP bestimmt, ein Einfluss der UCP2 ist jedoch anzunehmen. Für die B6- mt^{FVB} Maus konnte in der Leber eine vermehrte UCP2-Expression gezeigt werden (F. Koch, nicht veröffentlichte Daten). Würde eine Lipidbelastung auch in den β -Zellen eine gesteigerte Expression induzieren, wäre zu vermuten, dass durch das UCP2 die vorhandene geminderte ATP-Syntheseleistung der B6- mt^{FVB} Tiere potenziert wird. Das könnte die unter CD signifikant niedrigeren Seruminsulinspiegel erklären. Es würde auch erklären, dass bei dem B6- mt^{FVB} Stamm die zunächst erhöhte Insulinproduktion konsekutiv unter HFD abgenommen hat und eine weitere metabolische Belastung nicht durch erhöhte Insulinspiegel kompensiert wurde.

Die *mt-Atp8*-Genvariante der B6- mt^{FVB} Maus scheint vulnerabler für den Einfluss von Glucose und Lipide zu sein. Der primäre Schutzmechanismus über die UCP2 durch Senkung des Membranpotentials ist vermutlich bei diesem Genotyp gesteigert, sodass, wie Krauss et al. beschrieben, dieser kontinuierlich aufrecht erhaltene Zustand zu einer Dekompensation des Glucose-Insulin-Systems führt.

Die Insulinkonzentrationen im Serum sind jedoch in Verbindung mit der Masse der Insulin produzierenden β -Zellen zu werten.

4.3 Auswirkung der mitochondrialen Genvariante auf die Adaptation der β -Zellmasse

Bei der Bestimmung der β -Zellmasse fiel auf, dass der Stamm B6- mt^{FVB} nach drei Monaten Diätdauer unter beiden Diäten eine höhere β -Zellmasse hatte als der Stamm B6- mt^{AKR} . Während die B6- mt^{FVB} Tiere nach sechs Monaten der jeweiligen Diät keine signifikanten Veränderung der β -Zellmasse zeigten, wiesen die B6- mt^{AKR} Tiere unter HFD eine Verdreifachung und unter CD eine Verdopplung innerhalb der beiden Messzeitpunkte auf.

Physiologisch führen erhöhte Glucoselevel zu einer vermehrten Ausschüttung von Insulin, das den peripheren Glucoseumsatz erhöht und somit den Glucosespiegel reguliert. Das bietet einen Trigger für die β -Zellvermehrung (Palumbo and De Gaetano 2010; Porat et al 2011). In einer aktuellen Studie zeigte sich, dass B6- mt^{FVB} Mäuse unter HFD eine signifikant vermehrte β -Zellmasse verglichen mit B6- mt^{AKR} Mäusen nach drei Monaten Fütterung haben (Weiss et al 2012). Dieses Phänomen zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Anders als bei Weiss et al. zeigten sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Diäten. Möglicherweise spielt das Verfahren zur Bestimmung der β -Zellmasse hierbei eine Rolle. Während bei Weiss et al. nach der Insulinfärbung der pankreatischen Inseln eine Auswertung in Pixel pro Fläche erfolgte, ergab sich die β -Zellmasse der vorliegenden Arbeit durch die manuelle Verhältnisrechnung der Insulin-positiven Flächen zur Gesamtinselfläche. Die Tiere mit der *mt-Atp8*-Mutation zeigten im Rahmen der vorliegenden Studie eine eingeschränkte Adaptation der β -Zellmasse, sodass von beeinflussenden Faktoren ausgegangen werden kann.

In gesunden erwachsenen Individuen wird die β -Zellmasse durch Replikation differenzierter β -Zellen unter Stressbedingungen, wie die chronische Exposition hochkalorischer Nahrung, oder Hyperglykämie kontrolliert (Brennand et al 2007; Dor et al 2004). Das heißt, dass metabolische Anforderungen zelluläre Adaptationsvorgänge beeinflussen. Nahrungsaufnahme bzw. hohe Glucoselevel führen zu einer Zunahme der β -Zellreplikation und eine Abnahme der Insulinsensitivität induziert eine kompensatorische Zunahme der β -Zellmasse (Alonso et al 2007; Bonner-Weir et al 1989; Chick and Like 1971; Kulkarni et al 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die dauerhafte Nahrungsaufnahme in Form einer HFD nach sechs Monaten in dem B6- mt^{AKR} Stamm zu einer verstärkten Replikation der β -Zellen führte (s. 3.1.4). Dieser Genotyp adaptierte unter HFD mit einer Verdreifachung der β -Zellmasse, um eine mögliche Hyperglykämie zu verhindern. Dass bereits unter CD an die wiederholt nach Nahrungsaufnahme erhöhten Blutglucoselevel mit einer Verdopplung der β -Zellmasse nach sechs Monaten reagiert wurde, könnte auf eine physiologische altersentsprechende Zunahme der β -Zellmasse zurückzuführen sein (Montanya et al 2000). Im Pankreas zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen der β -Zellmasse und dem Körpergewicht bei Ratten, sodass selbiges auch für Mäuse anzunehmen wäre (Montanya et al 2000). Dass unter HFD die β -Zellmasse stärker als unter CD zunahm, lässt zusätzlich zur physiologischen Replikation eine gesteigerte Replikationsrate aufgrund der höheren metabolischen Belastung vermuten. Dass der B6- mt^{FVB} Stamm hingegen keine Veränderung der β -Zellmasse innerhalb des Messzeitraumes zeigte, könnte auf eine bei diesem Stamm

frühzeitigere Einschränkung der physiologischen Replikationsfähigkeit hindeuten (Bonner-Weir et al 2010; Cnop et al 2010).

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass das mutierte *mt-Atp8*-Gen zu einer eingeschränkten Adaptation der β -Zellmasse auf metabolischen Stress führt. Möglicherweise spielen hier Mechanismen eine Rolle, die die β -Zellreplikation beeinflussen.

Unter HFD ist die Glucokinase für die Replikation der β -Zellen essentiell, indem dadurch ATP generiert werden kann (Terauchi et al 2007). Dieser biochemische Prozess würde für die B6-mt^{FVB} Maus bedeuten, dass bei diesem Genotyp das ATP/ADP-Verhältnis nicht steigt und somit, durch die insuffiziente ATP-Synthase, eine Hyperglykämie nicht durch eine β -Zellreplikation kompensiert werden kann. Diese Annahme geht konform mit den Ergebnissen von Weiss et al. Die Arbeitsgruppe um Weiss et al. zeigte, dass die B6-mt^{FVB} Tiere unter HFD eine verminderte Größe der Mitochondrien der β -Zellen als unter CD, wogegen B6-mt^{AKR} Tieren unter HFD größere Mitochondrien hatten. Unter CD zeigten die B6-mt^{FVB} Mäuse größere Mitochondrien als die B6-mt^{AKR} Mäuse. Da es zu keiner Zunahme der Mitochondrienzahl kam, schlossen Weiss et al. daraus, dass die mitochondriale Kapazität der B6-mt^{FVB} Mäuse sich unter metabolischem Stress nicht adaptiert (Weiss et al 2012). Diese fehlende Adaptation der Mitochondrien würde mit der bereits erwähnten geringeren ATP Produktion bei gleichzeitig erhöhtem ATP-Bedarf einhergehen. Es würde das Signal für eine β -Zellreplikation fehlen. Das unterstützt die in der vorliegenden Arbeit detektierte fehlende Zunahme der β -Zellmasse bei den B6-mt^{FVB} Tieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mitochondrien der pankreatischen β -Zellen nicht isoliert untersucht. Eine Aussage über die Anzahl kann somit nicht getroffen werden. Es ist jedoch, wie bei Weiss et al. beschrieben, eine verminderte mitochondriale Kapazität (verminderte Fähigkeit zur ATP-Produktion) der B6-mt^{FVB} Mäuse anzunehmen. In diesem Zusammenhang ist auch der bereits erwähnte Weg, der über eine Inhibition der ABCA1-Transporter zu einer β -Zelldysfunktion führt (Brunham et al 2007), als unterstützender Pathomechanismus zu vermuten.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die fehlende β -Zellmassenzunahme der B6-mt^{FVB} Mäuse wäre in der Menge der ROS zu sehen. So wäre es möglich, dass die β -Zellen im B6-mt^{FVB} Stamm frühzeitig durch die verstärkt gebildeten ROS (Weiss et al 2012) geschädigt werden, so dass sie dadurch ihre Replikationskapazität verlieren. Für diese Annahmen würde auch das Ergebnis sprechen, dass die B6-mt^{FVB} Tiere zum ersten Messzeitpunkt diätunabhängig eine höhere β -Zellmasse als der B6-mt^{AKR} Stamm hatten. Würden ROS die mtDNA frühzeitig schädigen, könnte die Zellfunktion durch eine gesteigerte Replikation der weiteren β -Zellen zum Aufrechterhalten der Insulinproduktion dienen. Da dieser Zustand jedoch weitere ROS

produziert und damit die Zellen zunehmend schädigt, würde dieser Kompensationsmechanismus möglicherweise nicht weitergeführt werden können, stattdessen dekompensieren.

Bekannt ist, dass die β -Zellreplikation eine Altersabhängigkeit mit Minderung der Replikationskapazität mit zunehmenden Alter zeigt (Cnop et al 2010; Lee et al 2010; Perl et al 2010). In dem Fütterungszeitraum konnte eine generelle altersabhängige Minderung der Replikationskapazität, wie Cnop et al., Lee et al. und Perl et al. beschrieben, aufgrund der kurzen Studiendauer jedoch nicht angenommen werden.

Die Arbeitsgruppe um Kubota konnte zu dem zeigen, dass neben der Zunahme der β -Zellmasse auch eine verstärkte Insulinsekretion zur Aufrechterhaltung des Seruminsulinspiegels dient (Kubota et al 2000). Das könnte für die B6-mt^{FVB} Maus bedeuten, dass dieser Genotyp nicht mit einer Zunahme der β -Zellmasse, sondern mit einer Erhöhung der basalen Insulinsekretion erhöhte Blutglucosespiegel und andere Stresssituationen kompensiert. Die Hypothese von Kubota et al. kann für diesen Genotyp angenommen werden, da die B6-mt^{FVB} Mäuse keine Veränderungen der β -Zellmasse, aber dennoch erhöhte Insulinspiegel zeigten. Voraussetzung wäre dafür ein ausreichend hoher ATP-Status.

Dem B6-mt^{FVB} Stamm gelingt es zum Beispiel bei Leberschäden seinen Energiestatus (erhöhtes ATP/ADP-Verhältnis) durch verminderten ATP-Verbrauch aufrecht zu erhalten (Eipel et al 2011). Trifft dieses Phänomen auch auf die β -Zellen des Pankreas zu, würde dem B6-mt^{FVB} Stamm unter HFD genügend ATP zur Verfügung stehen, um Insulin sezernieren zu können, ohne die β -Zellmasse anpassen zu müssen. Das würde die bei diesem Genotyp detektierte Hyperinsulinämie ohne β -Zelladaptation erklären. Die Arbeitsgruppe um Weiss et al. zeigte jedoch, dass der B6-mt^{FVB} Stamm bei pankreatischen Inseln unter Glucosestimulation weniger ATP und keinen Unterschied des ATP/ADP-Verhältnisses gegenüber B6-mt^{AKR} Mäusen zeigt. Vermutlich sind β -Zellen sensibler für metabolische Belastungen und ihr ATP-Verbrauch höher als der von Hepatozyten, sodass es der β -Zelle eingeschränkter möglich ist, einen adäquaten Energiestatus aufrecht zu erhalten.

4.4 Auswirkung der mitochondrialen Genvariante auf den Leptinspiegel

Wie erwartet zeigten sich unter HFD signifikant höhere Leptinspiegel als unter CD. Zu beiden Zeitpunkten hatten die B6-mt^{FVB} Mäuse unter HFD höhere Leptinkonzentrationen als die B6-mt^{AKR} Mäuse.

Bekannt ist, dass Leptin von den Adipozyten direkt proportional zur Körperfettmasse gebildet wird (Friedman and Halaas 1998) und die Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht und die Glucosehomöostase reguliert (Friedman and Halaas 1998; Margetic et al 2002). Adipositas ist assoziiert mit einer Hyperleptinämie und begleitender Insulinresistenz (Considine et al 1996).

Unter HFD bildeten beide Mausstämme mehr Leptin als unter CD. Unter Betrachtung der gleichsam höheren Gewichte unter HFD, lässt sich eine vermehrte Adipozytenzahl vermuten, wodurch diese Leptinspiegel erklärt würden. Die Arbeitsgruppe um Holmstrom et al. konnte an leptindefizienten ob/ob-Mäusen bereits darstellen, dass Leptin die mitochondriale Funktion gewebespezifisch beeinflusst (Holmstrom et al 2013). Die ob/ob-Mäuse produzieren ein defektes (zu kurzes) Leptin, sind jedoch leptinsensitiv. So führt eine Gabe von Leptin bei diesen Mäusen zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und gesteigerten mitochondrialen Substratoxidation, wodurch eine Gewichtsabnahme erfolgte (Holmstrom et al 2013). Eine Überproduktion von Leptin bedingt durch HFD führt jedoch zu einer Abnahme der Leptinsensitivität mit konsekutiver funktionellen Leptinresistenz (Huang et al 2004; Zhang et al 2008) und damit zur kompensatorischen Hyperleptinämie. Diese kann die anorexigenen und gewichtsreduzierenden Funktionen nicht aufrecht erhalten (Dardeno et al 2010). Möglicherweise nimmt die Leptinsensitivität der B6-mt^{FVB} Mäuse frühzeitiger ab, was durch eine reaktive Hyperleptinämie kompensiert wird und anschließend in eine Leptinresistenz übergeht. Eine verminderte Leptinsensitivität würde erklären, dass bei diesem Genotyp höhere Leptinspiegel als bei den B6-mt^{AKR} Mäusen auftraten. Da die B6-mt^{FVB} Tiere im Vergleich zum Kontrollstamm eine eher geringere Körpermasse entwickelten, wäre eine in diesem Stamm höhere Adipozytenzahl bei gleichem Körpergewicht oder eine generell höhere Leptinsekretionsrate möglich. Die Leptinsekretionsrate steht dabei unter dem Einfluss von Regulationsmechanismen, wie die Wechselwirkung mit Insulin. Ein Einfluss von Leptin auf die Insulinsekretion wurde mehrfach gezeigt. So beeinflusst Leptin insulintypische Signalwege negativ (Morris and Rui 2009). Durch simultane Induktion der Leptinproduktion durch Insulin wird dieser gegenseitige Einfluss als ‚adipo-insuläre Achse‘ bezeichnet (Seufert 2004).

Leptin wirkt insbesondere auf die β -Zellen des Pankreas ein. Über Leptinrezeptoren der β -Zellen und intrazelluläre Signalwege nimmt Leptin direkten Einfluss auf die Insulinproduktion, Insulinsekretion und die β -Zellmasse (Marroqui et al 2012). Es hemmt die Insulinsekretion der β -Zellen (Emilsson et al 1997; Kulkarni et al 1997). Die Arbeitsgruppe um Park et al. erklärte die Insulinsekretionshemmung dadurch, dass erhöhte Leptinspiegel zu

einer Translokation der K_{ATP} -Kanäle in die Plasmamembran und damit zur Hyperpolarisation führen (Park et al 2013), wodurch die Insulinsekretion gesenkt wird. Dieser Mechanismus könnte für die B6- mt^{AKR} Maus die vergleichsweise niedrigeren Insulinkonzentrationen unter HFD verglichen mit den B6- mt^{FVB} Tieren erklären. Möglicherweise besteht bei diesem Genotyp eine länger andauernde pankreatische Leptinsensitivität gegenüber den B6- mt^{FVB} Mäusen, was auch die gleichzeitig geringeren Leptinmengen unterstützen würde. Physiologische Regelkreise wären folglich bei den B6- mt^{AKR} Tieren länger erhalten. Dass im B6- mt^{FVB} Stamm die Leptinkonzentrationen nach sechs Monaten anstiegen, wogegen die Insulinspiegel abnahmen, lässt auch eine Insulinhemmung durch Leptin in diesem Stamm vermuten.

Da bei erhöhter Fettmasse eine Leptinresistenz der β -Zellen besteht (Marroqui et al 2012), könnte das für die generell unter HFD verstärkte Insulinsekretion in beiden Mausstämmen im Vergleich zur CD mitverantwortlich sein.

Da der mutierte Genotyp gleichzeitig eine eingeschränkte Adaptation der β -Zellmasse zeigte, lässt sich auch der Einfluss des Leptins auf die β -Zellmasse annehmen (Marroqui et al 2012). Es konnte in vitro an humanen pankreatischen Inseln gezeigt werden, dass chronisch erhöhte Glucose- und Leptinkonzentrationen die Apoptose der β -Zellen induzieren und eine Adaptation hemmen (Maedler et al 2008; Maedler et al 2004). Möglicherweise trifft dieser Pathomechanismus insbesondere auf diesen Genotyp der *mt-Atp8*-Genvariante zu, so dass auch in vivo dieser inhibitorische Einfluss des Leptins auf die β -Zellen besteht.

Durch Aktivierung von bereits genannten K_{ATP} -Kanälen werden hypothalamische Proopiomelanocortin Neuronen hyperpolarisiert, sodass sie weniger sensibel für Leptin sind, was mit einer reaktiven Hyperleptinämie einhergeht (Plum et al 2006). In der Folge werden weniger anorexigene Neuropeptide gebildet, so dass Energieaufnahme und das Körpergewicht steigen. Da sich die vermehrte Nahrungsaufnahme (weitere Aufnahme von Glucose und Lipiden) auf die Insulinhomöostase auswirkt, entwickelt sich konsekutiv eine Insulinresistenz. Dieser Mechanismus wird als Ursache für eine simultane Leptin- und Insulinresistenz bei Übergewicht angenommen (Oswal and Yeo 2010). Für die B6- mt^{FVB} Maus wurde bereits gezeigt, dass die *mt-Atp8*-Genvariante frühzeitiger als bei den B6- mt^{AKR} Mäusen eine Insulinresistenz entstehen lässt (Weiss et al 2012). Die in der vorliegenden Arbeit detektierten erhöhten Leptinkonzentrationen der B6- mt^{FVB} Tiere lassen, gerade in Beachtung der gleichsam erhöhten Insulinspiegel, den geschilderten Pathomechanismus von Plum vermuten. Allerdings war bei den B6- mt^{FVB} Tieren die Nahrungsaufnahme nicht erhöht (H. Weiss, nicht

veröffentlichte Daten). Das kann darauf hindeuten, dass in dem beobachteten Zeitraum nur eine Abnahme der zentralen Leptinsensitivität, aber noch keine Leptinresistenz bestand. Gleichzeitig erklärt der Mechanismus die bei den B6-*mt*^{AKR} Tieren funktionierende Adaptation und Kompensation des metabolischen Stresses durch Aufrechterhalten physiologischer Regelkreise.

Eine wichtige Verbindung gibt es zwischen Leptin und dem bereits mehrfach genannten UCP2. Das Adipokin hemmt die Glucose-induzierte Expression des UCP2. Dadurch wird die Atmungskette weniger durch die UCP2 entkoppelt und kann mehr ATP generieren. Es resultieren höhere ATP/ADP-Level unter HFD (Brown et al 2002), um den Energiemetabolismus zu regulieren (durch Triggern der Insulinsekretion). In der Leber der B6-*mt*^{FVB} Tiere ist jedoch unter HFD die UCP2-Expression erhöht (F. Koch, nicht veröffentlichte Daten), was gegen diesen Mechanismus sprechen würde. Vermutlich ist dieser Schutzmechanismus der Leptin-induzierten UCP2-Hemmung bei den B6-*mt*^{FVB} Mäusen auch im Pankreas nicht suffizient genug, da neben höheren Leptinkonzentrationen unter HFD die Insulinspiegel nach sechs Monaten gegenüber den B6-*mt*^{AKR} Tieren niedriger waren. Das könnte auf einen verminderten ATP-Status deuten, der nicht durch eine UCP2-Hemmung kompensiert werden kann. Wahrscheinlich liegt auch das an einer bei den B6-*mt*^{FVB} Tieren verminderten Leptinsensitivität der β -Zellen.

Bei der geschlechtsspezifischen Analyse fiel dabei auf, dass weibliche B6-*mt*^{FVB} Mäuse höhere Leptinspiegel als die männlichen hatten. Dass das weibliche Geschlecht zu erhöhter Leptinproduktion neigt, konnte bereits beim Menschen gezeigt werden und wird zum Teil auf die Leptinproduktion in den Ovarien zurückgeführt (Kiess et al 2008). Das würde implizieren, dass bei weiblichen Individuen auch bei geringerer Fettmasse vergleichbar hohe Leptinkonzentrationen gebildet werden wie bei männlichen. In der vorliegenden Studie zeigten die weiblichen Mäuse ein tendenziell geringeres Körpergewicht. Es ist also anzunehmen, dass entweder das Leptin der Ovarien für die erhöhten Leptinspiegel der Weibchen verantwortlich ist oder die bei Weibchen höhere Fettmasse bei gleichem Körpergewicht.

Die Mutation im *mt-Atp8*-Gen führte unter HFD zu höheren Leptinspiegeln. Vermutlich neigt die *mt-Atp8*-Genvariante zu einer stärkeren Leptinproduktion, die jedoch den Schutz vor vermehrter Nahrungsaufnahme und damit zusätzlicher metabolischer Belastung nicht lange funktionierend aufrecht erhalten kann.

4.5 Auswirkungen der Genvariante des *mt-Atp8*-Gens auf die Lipidakkumulation in der Leber und Ausbildung einer Steatosis hepatis

Der Einfluss einer metabolischen Belastung durch HFD und CD auf die Lipidakkumulation der Leber wurde für die conplastischen Mausstämme B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass der Stamm B6-mt^{FVB} mit der mitochondrialen Mutation keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Diäten zeigte, wogegen der Stamm B6-mt^{AKR} unter HFD mehr TG in der Leber speicherte. Unter beiden Diäten hatten die B6-mt^{FVB} Tiere signifikant höhere intrahepatische Lipidspiegel als die B6-mt^{AKR} Tiere. Auffallend war, dass die männlichen Tiere eine stärkere Lipidakkumulation in der Leber zeigten als die weiblichen.

Diese Ergebnisse führten zu der Frage, welche pathobiochemische Verbindung zwischen der Diät und der Mutation sowie der Entwicklung einer Steatosis hepatis besteht. Es wurde geschaut, welchen Einfluss das Geschlecht auf die intrahepatische Lipidspeicherung nimmt.

Durch HFD kommt es aufgrund der Lipidoxidation zu einer verstärkten Bildung von ROS mit zusätzlicher Lipidtoxizität, was zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion führt. Der Einfluss zeigt sich in einem verminderten Lipid- und Glucosemetabolismus mit Abnahme der hepatischen Insulinsensitivität. Diese Beeinträchtigung wird als wesentlicher Ausgangspunkt für die Ausbildung einer Fettleber angesehen (Chavin et al 1999).

Ecclestons Arbeitsgruppe konnte für männliche B6-Mäuse zeigen, dass sich die Lipidakkumulation in der Leber nach einer Fütterungsdauer von vier Monaten zeigt (Eccleston et al 2011). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die gesteigerte Akkumulation von Triglyceriden in der Leber unter HFD in beiden Stämmen bereits nach 3 Monaten. Die Arbeitsgruppe um Eccleston konnte für die hepatische Lipidspeicherung ein Defizit der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase 2 und des Elektronen-transferierenden-Flavoproteins α nachweisen. Hierdurch wird u.a. die β -Oxidation gestört und die Kopplung an die oxydative Phosphorylierung herabgesetzt, was in einer Akkumulation von Triglyceriden in der Leber resultiert. Entsteht die Steatosis hepatis durch Übergewicht infolge metabolischen Stresses, so wird hierdurch folglich die ATP-Synthese-Leistung in der Leber vermindert. Pathobiochemisch liegt dieser verminderten ATP-Synthese-Leistung eine gesteigerte ROS-Produktion der Atmungskettenkomplexe der Mitochondrien mit Bildung von Lipidperoxiden zugrunde. Die Lipidperoxide führen zu einer zusätzlichen Schädigung der mtDNA, inaktivieren die Cytochrom-c-Oxidase IV (COX IV) der Atmungskette und initiieren eine Apoptose (Morris et al 2011). In der Folge ist der oxidative Abbau der Fettsäuren

herabgesetzt und es steigen die Triglyceride der Leber. Da die B6-mt^{FVB} Maus bereits unter geringem metabolischem Stress (unter CD) vermehrt ROS produziert (Weiss et al 2012), könnte der genannte Mechanismus die bereits unter CD in diesem Stamm signifikant vermehrt gespeicherten Lipide erklären.

Die Arbeitsgruppe um Eccleston fand ferner heraus, dass durch HFD 4 Proteine, die an der Oxydativen Phosphorylierung beteiligt sind, verändert werden. Das führt zu einer verminderten ATP-Produktion bei einem gleichzeitigen Anstieg der ROS-Produktion (Eccleston et al 2011). Die mitochondriale Fettsäureoxidation, welche NADH + H⁺ und FADH₂ als Reduktionsäquivalente für die Atmungskette produziert, erfordert eine Aktivitätssteigerung der Atmungskette (Begriffe et al 2011; Fromenty and Pessayre 1995). Die durch die Fettsäureoxidation erhöhte Anforderung an die Atmungskettenaktivität führt, wie bereits beschrieben, zu einer gesteigerten ROS-Produktion und Schäden der mtDNA. Eine durch eine Dysfunktion der Mitochondrien gesteigerte Produktion von ROS kann nicht suffizient, z.B. durch die Mangan-Superoxiddismutase zu H₂O₂ und weiter durch die Glutathion-Peroxidase und Glutathion zu H₂O, reduziert werden (Begriffe et al 2006; Begriffe et al 2011). ROS beeinflussen die ATP-Synthese negativ. Eine zusätzliche mtDNA-Schädigung durch Beeinflussung der OXPHOS-Komplexe, wie Eccleston et al. beschrieben, würde den negativen Einfluss der ROS auf die Atmungskettenaktivität steigern, was zu einer vermehrten Bildung von Lipidperoxiden und damit zu einer erhöhten Lipidspeicherung der Leber führen kann. Das würde die bei dem mutierten Genotyp detektierte, frühzeitiger und intensiver ausgeprägte Steatosis hepatis im Vergleich zum B6-mt^{AKR} Stamm erklären. Auffällig war, dass bei den B6-mt^{FVB} Tieren zu beiden Messzeitpunkten die Lipidspeicherung der Leber diätunabhängiger als bei den B6-mt^{AKR} erfolgte und diese auch signifikant mehr Lipide in die Leber einlagerten. Die untersuchte Genvariante des *mt-Atp8*-Gens der F₀-Untereinheit der ATP-Synthase scheint hierbei ein Funktionsdefizit der ATP-Synthase zu bedingen (Weiss et al 2012; Yu et al 2009a; Yu et al 2009b), was die intrahepatische Stoffwechsellage beeinflusst. Dadurch wird die Insulin-abhängige Glucoseaufnahme gestört (Summers et al 1998), was zu einer hepatischen Insulinresistenz führt (Asrih and Jornayvaz 2013; Jornayvaz et al 2011; Jornayvaz et al 2010).

Normalerweise führt Insulin in Verbindung mit Glucose über die vermehrte Bildung von Malonyl-CoA zu einer Hemmung der β -Oxidation freier Fettsäuren und somit zur Aktivierung der de novo Lipogenese (Boden et al 2005; Ruderman et al 1999). Die gesteigerte ROS-Synthese führt jedoch, in Verbindung mit intrazellulären Triglyceriden und

Lipidintermediate wie Diacylglycerol und Ceramide, zu einer Hemmung des Insulinsignalwegs. Die Abnahme der Insulinsensitivität bedingt eine gesteigerte Lipolyse und damit einen Anstieg nicht-veresterter Fettsäuren, obwohl bei einer Insulinresistenz-assoziierten Hyperinsulinämie die hepatische de novo Lipogenese gesteigert ist (Begriffe et al 2013). Dieses Phänomen wird als ‚selektive Insulinresistenz‘ bezeichnet (Brown and Goldstein 2008). Dabei sind die Insulinwirkungen auf den Glucosemetabolismus gestört (keine Hemmung der Gluconeogenese), wogegen die auf den Lipidmetabolismus erhalten bleiben (Lipogenese, Bildung von TG aus Glucose), sodass eine Co-Existenz aus Hyperglykämie und Dyslipidämie entsteht (Nakamura and Terauchi 2013). Die in beiden Mausstämmen gesteigerten hepatischen Lipidkonzentrationen unter HFD lassen in Verbindung mit den entsprechend erhöhten Insulinspiegeln den genannten Mechanismus vermuten. Für die B6-*mt*^{FVB} Maus bedeutet das, dass die kompensatorische Hyperinsulinämie mit einer deutlichen Dyslipidämie in Form einer gesteigerten Lipidakkumulation einhergeht. Beides stellte sich in den vorliegenden Untersuchungen korrelierend heraus.

Um eine frühzeitige Abnahme der hepatischen Insulinsensitivität aufgrund einer HFD zu vermindern, gibt es für die Leber schützende Mechanismen. Das Leptin führt physiologisch zu einer verminderten Lipidakkumulation in der Leber, sodass bei HFD der Lipidgehalt der Leber weniger steigt als in Adipozyten (Chitturi et al 2002), und erhöht die hepatische Insulinsensitivität. Da die B6-*mt*^{FVB} Maus unter HFD keine stärker ausgeprägte Steatosis hepatis gegenüber der CD zeigte, lässt sich ein schützender Einfluss durch die bei diesem Stamm erhöhten Leptinspiegeln vermuten. Dass sich zwischen beiden Messzeitpunkten keine Unterschiede der Mengen intrahepatischer Lipide zeigten, unterstützt auch die Ergebnisse von Chitturi et al., dass die Leptinmenge mit dem Ausmaß der Leberlipide korreliert. Allerdings zeigte die B6-*mt*^{FVB} Maus generell höhere Triglyceridgehalte der Leber als der B6-*mt*^{AKR} Stamm. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass der schützende Einfluss vor einer Steatosis durch Leptin im Stamm mit dem mutierten *mt-Atp8*-Gen frühzeitiger gestört wird.

Die Arbeitsgruppe um Chavin untersuchte als weiteren Schutzmechanismus an isolierten Lebermitochondrien von ob/ob-Mäusen den Einfluss des ‚uncoupling protein 2‘ (UCP2) auf die Mitochondrienfunktion. Eine chronische HFD führt wahrscheinlich kompensatorisch zu einem Anstieg der UCP2 mRNA- und Proteinexpression (Chavin et al 1999) und stellt einen Schutzmechanismus dar, durch den der Anteil intrahepatischer Lipide gesenkt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde das UCP2 nicht untersucht, jedoch könnte dieser Mechanismus ebenfalls eine Rolle gespielt und zu den vorliegenden Ergebnissen geführt haben. Für die B6-*mt*^{FVB} Maus konnte gezeigt werden, dass bei diesem Genotyp unter HFD

ein stärkerer Anstieg der UCP2-Genexpression im Vergleich zum B6-mt^{AKR} Stamm messbar ist (F. Koch, unveröffentlichte Daten).

Die vorliegende Arbeit gibt einen Hinweis darauf, dass die Genvariante des *mt-Atp8*-Gens wie bei den B6-mt^{FVB} Mäusen eine Beeinträchtigung der Atmungskette bedingt. Diese Beeinträchtigung könnte erklären, dass in diesem Genotyp die physiologischen Regelkreise gestört sind und bereits unter normokalorischen Konditionen pathologische Prozesse, wie die hepatische Lipideinlagerung, ablaufen. Das lässt sich aus den genannten Ergebnissen ableiten. Unter normokalorischen Bedingungen führt die mitochondriale Mutation zu einem Nachteil im Stoffwechsel von Nahrungslipiden, da bereits hier die hepatische Lipidakkumulation signifikant gesteigert ist. Unter hochkalorischen Bedingungen verschafft die Mutation hingegen einen gewissen adaptiven Vorteil, da sich das gesteigerte Nährstoffangebot nicht exzessiv auf die Lipidspeicherung der Leber auswirkt. Identisch verhielt es sich auch bei der Betrachtung Lipidakkumulation im Verlauf der Lebenszeit. Die bereits nach drei Monaten Diätdauer signifikant vermehrt gespeicherten intrahepatischen Lipide wurden nach sechs Monaten unter der jeweiligen Diät nicht zusätzlich gesteigert.

4.6 Hämatologische Adaptation der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Maus

Die hämatologische Untersuchung des Blutes beider Mausstämme ergab im Hinblick auf die Zellassemblierung folgende Ergebnisse. Bei den Erythrozyten zeigte der Kontrollstamm keine diätabhängigen Unterschiede, wogegen der B6-mt^{FVB} Stamm unter HFD weniger Zellen zur Verfügung hatte als unter CD. Bei beiden Stämmen sank die Zellzahl zwischen drei und sechs Monaten.

Erythrozyten

Es ist bekannt, dass Erythrozyten mehr als andere Zellen oxydativen Stress kompensieren müssen. Als Ursache hierfür werden das Hämoglobineisen und der transportierte Sauerstoff gesehen, wodurch H₂O₂ und Lipidperoxide spontan entstehen können (Johnson et al 2005; Lee et al 2003). Als Schutz vor diesen Peroxiden besitzen Erythrozyten u.a. das Enzym Peroxidoxin (Syn.: Peroxiredoxin), was diese Radikale neutralisiert (Rabilloud et al 1995). Gerade in früher Differenzierungsphase, auf Ebene der erythrozytären Vorstufen, liegt eine erhöhte Menge dieses Enzyms vor, da hier aufgrund der Differenzierungsvorgänge besonders

hohe Mengen an Peroxiden anfallen (Rabilloud et al 1995). Unter normalen Bedingungen, also ohne Exposition weiterer ROS, sind Erythrozyten vor Schäden durch Peroxide durch eigene Enzymsysteme geschützt (Valentine and Paglia 1990; Valentine and Paglia 1991). Eine Exposition von ROS führt zur Bildung von Peroxiden in Erythrozyten und verkürzt die Lebensspanne der Zellen, es entsteht eine Anämie (Lee et al 2003; Wang et al 2010). Dieser dekompensierende Schutzmechanismus unter dem Einfluss von vermehrten ROS könnte die bei den B6-mt^{FVB} Tieren detektierte geringere Anzahl der Erythrozyten unter der HFD erklären. Wie bereits mehrfach erwähnt, führt eine HFD zur vermehrten Bildung von ROS und dieser Mausstamm konditioniert für eine verstärkte ROS-Bildung (Weiss et al 2012). Die somit gesteigerte Exposition von Peroxiden könnte womöglich nicht ausreichend neutralisiert werden, sodass frühzeitiger Zellschäden anfallen und der Zelltod eintreten würden (Lee et al 2003). Dass der Stamm B6-mt^{AKR} keine Diätabhängigkeit zeigte, lässt vermuten, dass bei diesem Stamm die protektiv wirkenden Enzyme, wie das Peroxidoxin, auch unter einer HFD noch hinreichend wirken. In der vorliegenden Studie wurden die Erythrozyten nach drei und sechs Monaten bestimmt. Möglicherweise zeigt der Kontrollstamm nach einer längeren Lebenszeit ein ähnliches Absinken der Erythrozytenzahl unter HFD wie der B6-mt^{FVB} Stamm.

Leukozyten

Bei den Leukozyten zeigte sich, dass unter beiden Diäten die B6-mt^{FVB} Tiere nach sechs Monaten eine geringere Zellzahl hatten als die B6-mt^{AKR} Tiere. Unter HFD synthetisierten die B6-mt^{FVB} Tiere mehr Leukozyten als unter CD.

Eine HFD ist assoziiert mit einer gering-gradigen Inflammation, die zu einer Ausschüttung von Adipokinen, Leptin und proinflammatorischen Zytokinen ins Blut führt (Hotamisligil et al 1993; Trottier et al 2012). Dadurch kommt es zu einer Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in Gewebe wie Adipozyten oder der Leber (Pettersson et al 2011). Im Ergebnis kann es zu einem Absinken der Leukozytenzahl im Blut kommen und neue Zellen müssen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks neu gebildet werden (Trottier et al 2012). Ein u.a. in der antiinflammatorischen Wirkung der Leukozyten anfallendes Produkt sind ROS (Mohanty et al 2000). Hohe Glucoselevel oder Lipide, wie sie in einer HFD vorliegen, führen zu einer Zunahme der ROS-Produktion in Leukozyten, wodurch diese Zellen auch sich selbst schaden (Mohanty et al 2000). Dieser Pathomechanismus könnte die bei den B6-mt^{AKR} Tieren detektierten geringeren Leukozytenzahlen unter HFD gegenüber der CD erklären. Die an die Leukozyten gerichtete höhere Anforderung könnte mit einer Steigerung der ROS-Synthese

und damit einer Zellschädigung einhergehen. Da sich hingegen bei den B6-mt^{FVB} Tieren gegenteiliges zeigte, obwohl dieser Stamm für eine höhere ROS-Synthese als der Kontrollstamm konditioniert, müsste ein protektiver Faktor unter HFD in diesem Stamm vorliegen. Ein möglicher Erklärungsansatz würde in der Höhe des Insulinspiegels liegen. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Insulinspiegel die ROS-Synthese der Leukozyten und damit derer Zelltoxizität senken (Dandona et al 2001; Mohanty et al 2000). Da die B6-mt^{FVB} Maus unter HFD eine Hyperinsulinämie entwickelte, könnte diese Hyperinsulinämie zu einer verminderten ROS-Produktion der Leukozyten geführt und damit das Zellüberleben gesichert haben. Die Insulin-Hypothese würde auch die bei diesem Mausstamm unter CD niedrigeren Leukozytenzahlen unterstützen, da unter CD ein nur sehr geringer Insulinspiegel gemessen wurde.

Im Folgenden soll auf einzelne Subpopulationen der Leukozyten eingegangen werden.

Neutrophile infiltrieren als erstes das Fettgewebe oder die Leber während einer Inflammation und je stärker die Inflammation, desto mehr Neutrophile werden aus den Blutgefäßen in die Gewebe rekrutiert (Talukdar et al 2012). Ihre Synthese im Knochenmark wird von verschiedenen Zytokinen und Induktoren, wie dem ‚Granulocyte colony stimulating factor‘ reguliert (Borregaard 2010). Da die Ausschüttung dieses Faktors insbesondere durch verschiedene Zytokine nach Apoptose von Neutrophilen induziert wird, ergibt sich daraus, dass bei hoher Zellzahl in Geweben, dieser Faktor supprimiert wird (Borregaard 2010). Dadurch sinkt die Neusyntheserate aus Stammzellen und die Neutrophilenzahl im Blut sinkt. Dieser Pathomechanismus unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Neutrophilenzahlen unter HFD gegenüber der CD. Bei den B6-mt^{FVB} Tieren könnte aufgrund der gesteigerten ROS-Synthese und frühzeitigeren Abnahme der peripheren Insulinsensitivität unter HFD eine stärker ausgeprägte Inflammation vorliegen. Diese würde nach Talukdar et al. zu einer stärkeren Rekrutierung der Neutrophilen ins Gewebe und wie beschrieben zum Absinken der Zellzahl im Blut führen. Da es eine kontinuierliche Syntheserate der Neutrophilen gibt, die Rekrutierung ins Gewebe dagegen vom Ausmaß der Inflammation abhängt (Borregaard 2010; Talukdar et al 2012), könnte das auch die bei den B6-mt^{FVB} Tieren unter CD höheren Zellzahlen erklären. Womöglich liegt hier eine geringere Inflammation vor, so dass die Zahl der rekrutierten Neutrophilen durch die Neusynthese kompensiert und so kein Absinken der Neutrophilen im Blut gemessen werden kann. Da es zwischen den B6-mt^{FVB} Tieren unter CD und den B6-mt^{AKR} Tieren unter HFD keine Unterschiede der

Neutrophilenzahl gab, wäre ein ähnlicher Inflammationsstatus bei diesen beiden Gruppen zu vermuten.

Neutrophile Granulozyten sezernieren Mediatoren, um andere Immunzellen wie Monozyten zu rekrutieren (Talukdar et al 2012). Gleichzeitig sind die Zytokine und Adipokine des Fettgewebes selbst Aktivatoren der Monozyten und rekrutieren diese Zellen (Elgazar-Carmon et al 2008). Eine stärkere Inflammation würde folglich auch mit einer verstärkten Gewebeeinfiltration von Monozyten einhergehen und die Zellzahl im Blut senken (Trottier et al 2012). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hypercholesterinämie die Differenzierung der Monozyten stimuliert und die Zellzahl im Blut hebt (Soehnlein et al 2013). Diese Annahme unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gemessenen höheren Monozytenzahlen unter HFD gegenüber CD. Beide Stämme entwickelten eine Hypercholesterinämie nach sechs Monaten. Diese Hypercholesterinämie könnte zu einer gesteigerten Differenzierungsrate der Monozyten geführt haben. Da womöglich gleichzeitig unter HFD ein höherer Inflammationsstatus vorlag, sind Monozyten in die Gewebe rekrutiert worden, sodass simultan Zellen aus dem Blut ins Gewebe übergangen. Dass die B6-mt^{FVB} Maus nach drei Monaten eine höhere Monozytenzahl als der Kontrollstamm hatte, lässt sich eine bei diesem Mausstamm früher beginnende Inflammation und Differenzierungsrate der Monozyten vermuten. Diese Annahme wird durch die von Soehnlein et al. beschriebenen Ergebnisse unterstützt. Hier führten über monozytäre Rezeptoren durch HFD induzierte Mediatoren zu einer Zunahme der Monozyten im Blut.

Lymphozyten werden u.a. durch Leptin stimuliert, d.h. erhöhte Leptinspiegel führen zu einem Anstieg der Lymphozytenzahl im Blut (Claycombe et al 2008; Fantuzzi and Faggioni 2000). Eine Leptinresistenz bzw. eine Abnahme der Leptinsensitivität kann die Lymphozytenzahl senken (Palmer et al 2006). Dadurch würden sich die in der vorliegenden Arbeit detektierten Lymphozytenzahlen erklären lassen. Da unter HFD erhöhte Leptinwerte gemessen wurden, könnten diese bei den B6-mt^{FVB} Tieren zu der im Vergleich zur CD höheren Lymphozytenzahl geführt haben. Dass der Stamm B6-mt^{FVB} geringere Lymphozytenzahlen nach sechs Monaten hatte als der Kontrollstamm, könnte auf eine bei diesem Stamm beginnende Abnahme der Leptinsensitivität deuten.

Bei den Eosinophilen zeigten sich zwischen beiden Stämmen keine signifikanten Unterschiede. Es kam lediglich zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl von drei auf sechs Monate.

Im Hinblick auf die Zahlen aller Blutzellen und die Interpretation muss bedacht werden, dass die Messungen jeweils nur zu zwei Zeitpunkten (drei und sechs Monate) erfolgte. Die Schwankungen und Unterschiede zwischen den Stämmen und Diäten lagen jeweils im Referenzbereich der jeweiligen Zelltypen. Möglicherweise würden bei einer längeren Studiendauer die Ergebnisse variieren und auch Zellzahlen außerhalb des Referenzbereiches miteinschließen.

4.7 Ausblick

Es ist bekannt, dass sich unter einer HFD Kompensationsmechanismen ausbilden, welche die Entwicklung eines metabolischen Syndroms beeinflussen. Generell fördert eine HFD die Entstehung eines ‚Metabolischen Syndroms‘ mit Entwicklung von Dyslipidämien, Steatosis hepatis, Hypertonie, Arteriosklerose und T2DM.

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell vorgestellt, das es ermöglicht, den Einfluss einer definierten mitochondrialen Mutation in dem ATP-bildenden OXPHOS Komplex V auf zellulärer und metabolischer Ebene zu untersuchen. Die verwendeten B6 Mausstämmen FVB und AKR unterscheiden sich nur im *mt-Atp8*-Gen, sodass es möglich war, differenziert den Einfluss mitochondrialer Genvariationen zu eruieren.

Da das *mt-Atp8*-Gen negative Auswirkungen auf die Aktivität mitochondrialer ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette) somatischer Zellen besitzt, besteht die Möglichkeit, verschiedene Adaptationsprozesse im Metabolismus zu untersuchen. Neben der Adaptation der β -Zellmasse und Insulinkonzentration auf eine metabolische Belastung (HFD), kann der Lipidmetabolismus in Hinblick auf Dyslipidämien und einer Steatosis hepatis betrachtet werden.

Die vorliegende Studie hat 2 wichtige Erkenntnisse über die Effekte mitochondrialer Mutationen auf den Glucose- und Lipidmetabolismus ergeben:

1. Die *Atp8*-Mutationen sind stark gewebespezifisch in ihrer Auswirkung auf die zellulären Funktionen. Während im endokrinen Pankreas die Insulinsekretionsstörung durch eine Zunahme der β -Zellmasse kompensiert wird, steht in der Leber die Fetteinlagerung und Progredienz der Steatose im Vordergrund. Diese Lebersteatose ist primär nicht durch einen erhöhten Inflammationsstatus des (viszeralen) Fettgewebes bedingt, der bei beiden conplastischen Mausstämmen vergleichbar ist.
2. Die mitochondrial-induzierten Veränderungen sind insbesondere in der frühen Lebensphase zu beobachten. Dies bedeutet eine Vermeidung von metabolischen Stresssituationen und Adipositas im Kindes- und Jugendalter bzw. eine detaillierte Untersuchung adipöser Jugendlicher auf mitochondriale Mutationen.

Aus der Kenntnis dieser mitochondrialen Pathomechanismen lassen sich Therapiekonzepte ableiten, die einen positiven Einfluss auf zellulärer und mitochondrialer Funktion insbesondere der Leber nehmen. Dies bedeutet konkret, dass Lebensstil-Intervention bereits

konsequent im Kindes- und Jugendalter vorgenommen werden müssen, da sich zu dieser Zeit bereits signifikante Auswirkungen des metabolischen Stresses in Form einer Lebersteatose zeigen. Diese Veränderungen verlaufen in einem frühen Stadium klinisch still (im Sinne von symptomarm), können jedoch sukzessive mit steigenden Lebensalter durch die Signalfunktion der Leber für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms zu vaskulären Spätschäden führen, die das Lebensalter negativ beeinflussen können. Daher sollte schon in jungem Alter eine angemessene Balance aus körperlicher Aktivität und Ernährung (verminderte Energiedichte und Lipidreduktion) hergestellt werden.

5 Zusammenfassung

Chronische metabolische Belastungen durch hyperkalorische Ernährung führen zu dem Symptomkomplex des metabolischen Syndroms. Im Rahmen des Adipositas kommt es zur Ausbildung einer Insulinresistenz mit konsekutivem T2DM, Dyslipidämien, einer Steatosis hepatis und durch Gefäßbeteiligung zur Atherosklerose mit Hypertonie. Bei der Entstehung des metabolischen Syndroms trägt ein gestörter mitochondrialer Energiemetabolismus in der Leber zur Ausbildung einer Steatose und ROS Generierung bei. Die Rolle von mitochondrialen DNA-Mutationen in der Pathogenese des metabolischen Syndroms und der Lebersteatose wurde bislang nicht im Detail charakterisiert. Es war das Ziel der vorliegenden *in-vivo* Studie, anhand eines conplastischen B6-FVB Mausmodells den mitochondrialen Einfluss des *Atp8*-Gens, das für eine Untereinheit der ATP-Synthase kodiert, auf den Glucose- und Lipidstoffwechsel und hepatische Adaptationsmechanismen zu untersuchen.

Tiere mit dem Genom der B6-mt^{FVB} Maus unterscheiden sich vom B6-mt^{AKR} Genom lediglich im mitochondrialen (*mt*)-*Atp8*-Gen. Die ATP-8 Untereinheit vermittelt die korrekte Assemblierung des ATP-Synthasekomplexes. Zur Simulation einer metabolischen Stressbelastung erhielten die Tiere der B6-mt^{FVB} und B6-mt^{AKR} Kohorten über einen Zeitraum von sechs Monaten eine Hochfettdiät (60 % des Energiegehalts) im Vergleich zu einer Standard-Kontrolldiät (10% Fett). Als Schlüsselparameter für die metabolischen Effekte wurden die Gewichtsverläufe, Blutglucose, Seruminsulin- und Serumleptinkonzentrationen, Plasmatriglyceride und Plasmacholesterin dokumentiert. Daneben wurde die β -Zellmasse in Pankreasschnitten histologisch quantifiziert, sowie der intrahepatische Lipidgehalt. Die systemischen zellulären Entzündungsparameter wurden anhand von Differenzialblutbildern dokumentiert.

Die fettreiche Diät führte sowohl bei den B6-mt^{FVB} als auch B6-mt^{AKR} Tieren zu einer signifikant höheren Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrolldiät mit niedrigerer Energiedichte. Dabei war das Ausmaß der Gewichtszunahme zwischen den beiden conplastischen Stämmen vergleichbar. B6-mt^{FVB} Tiere zeigten unter fettreicher Diät höhere Blutglucosespiegel als der B6-mt^{AKR} Kontrollstamm mit prädiabetischen Glucosewerten (7,8 mmol/l – 9,0 mmol/l). In B6-mt^{FVB} Tieren konnten in den ersten 3 Monaten der fettreichen Diät signifikant höhere Seruminsulinspiegel nachgewiesen werden, die in den Monaten 4 – 6 jedoch gegenüber den B6-mt^{AKR} Tieren im Rahmen einer β -Zell-Dekompensation abnahmen. Diese fehlende Kompensationsfähigkeit der B6-mt^{FVB} Tiere an eine persistente Hochfettdiät zeigte sich auch bei der β -Zellmasse. Während der

Kontrollstamm an den gesteigerten Insulinbedarf unter Hochfettdiät mit einer Verdreifachung der β -Zellmasse reagierte, fiel die Steigerung der β -Zellmasse in B6- mt^{FVB} Tieren signifikant geringer aus. Mit Zunahme der Körpermasse und des viszeralen Fettgewebes produzierten beide Genotypen unter Hochfettdiät signifikant mehr Leptin als unter Kontrolldiät. Dabei konnten bei den B6- mt^{FVB} Mäusen höhere Leptinspiegel als im Kontrollstamm nachgewiesen werden. Im Blutlipidprofil zeigten B6- mt^{FVB} Tiere in den ersten 3 Monaten der Hochfettdiät geringere Mengen an Plasmacholesterin bei signifikant höheren Triglyceridkonzentrationen im Vergleich zu den B6- mt^{AKR} Tieren. Diese höheren Plasmalipide der B6- mt^{FVB} Tiere normalisierten sich im Verlauf der Monate 4 - 6. Interessanterweise konnte bei B6- mt^{FVB} Tieren bereits unter Kontrolldiät ein signifikant höherer Lipidgehalt in der Leber nachgewiesen werden. Auf der Basis dieser Fetteinlagerung führte eine Hochfettdiät nicht zur Entwicklung einer Steatosis hepatis bei den B6- mt^{FVB} Tieren aufgrund mitochondrial-induzierter Adaptationsmechanismen. In einem Geschlechtsdimorphismus zeigten männliche Tiere höhere Cholesterinspiegel und intrahepatische Lipide bei geringeren Plasmatriglyceriden. In den Differentialblutbildern führte die Hochfettdiät nicht zu Veränderungen, die auf einen erhöhten systemischen Inflamationsstatus schließen lassen. Die *mt-Atp8*-Mutation führte zu einer frühzeitigeren und signifikanten Verschlechterung der Stoffwechsellage, insbesondere unter metabolischer Belastung in der initialen Phase der Hochfettdiät. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer gesteigerten Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die für die *mt-Atp8*-Genmutation in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden konnte. ROS können die mtDNA schädigen und durch eine nachgewiesene Abnahme der zellulären ATP Produktion die mitochondriale Funktion beeinträchtigen. In den β -Zellen des Pankreas und der Leber kann eine metabolische Belastung zu gravierenden Störungen des Glucosestoffwechsels führen. Dabei führt die *mt-Atp8*-Genmutation in der initialen Phase der Hochfettdiät, die bezogen auf die Situation beim Menschen einer juvenilen Adipositas entspricht, zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer Fetteinlagerung in der Leber und erhöhten Blutglucosespiegeln. Nach den Differentialblutbildern sind diese Effekte durch mitochondriale Signalwege und nicht durch systemische Inflamationsmechanismen bedingt. Auch wenn im weiteren Verlauf der Hochfettdiät Adaptationsmechanismen die Lebersteatose und die β -Zellproliferation in der Intensität begrenzen, können frühe Stressreaktionen bei vorliegenden mitochondrialen DNA-Mutationen eine Dysfunktion von Schlüsselorganen des Metabolismus begünstigen und hierüber die Lebenszeit signifikant beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, et al (2007): Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes* 56:1792-801.
- Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A (2013): The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front Neurosci* 7:51.
- Arner P (2005): Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:471-82.
- Asrih M, Jornayvaz FR (2013): Diets and nonalcoholic fatty liver disease: The good and the bad. *Clin Nutr*.
- Bach D, Naon D, Pich S, et al (2005): Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54:2685-93.
- Bach D, Pich S, Soriano FX, et al (2003): Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278:17190-7.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005): Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-95.
- Barbieri E, Sestili P (2012): Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct* 2012:982794.
- Bateson M, Devenish RJ, Nagley P, Prescott M (1999): Single copies of subunits d, oligomycin-sensitivity conferring protein, and b are present in the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ATP synthase. *J Biol Chem* 274:7462-6.
- Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B (2006): Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6:1-28.
- Begrich K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B (2013): Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*.
- Begrich K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B (2011): Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol* 54:773-94.
- Bender JG, Van Epps DE, Stewart CC (1987): Regulation of myelopoiesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 10:79-91.
- Bjornholm M, He AR, Attersand A, et al (2002): Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia* 45:1697-702.
- Bjorntorp P (1992): Abdominal fat distribution and the metabolic syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 8:S26-8.
- Boden G, She P, Mozzoli M, et al (2005): Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 54:3458-65.
- Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC (1989): Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38:49-53.
- Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A (2010): Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes* 59:2340-8.
- Bonner-Weir S, Orci L (1982): New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 31:883-9.
- Borregaard N (2010): Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33:657-70.
- Brennand K, Huangfu D, Melton D (2007): All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *PLoS Biol* 5:e163.
- Brown JE, Thomas S, Digby JE, Dunmore SJ (2002): Glucose induces and leptin decreases expression of uncoupling protein-2 mRNA in human islets. *FEBS Lett* 513:189-92.
- Brown MS, Goldstein JL (2008): Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 7:95-6.
- Brownlow BS, Petro A, Feinglos MN, Surwit RS (1996): The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 60:37-41.

- Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, et al (2007): Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 13:340-7.
- Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR (1997): Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88:561-72.
- Carter CP, Howles PN, Hui DY (1997): Genetic variation in cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J Nutr* 127:1344-8.
- Carvalho JB, Qiu Y, Chawla A (2013): Blood spotlight on leukocytes and obesity. *Blood* 122:3263-7.
- Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, et al (2003): Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 12:805-16.
- Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G (2002): Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *Faseb J* 16:1163-76.
- Chavin KD, Yang S, Lin HZ, et al (1999): Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 274:5692-700.
- Chick WL, Like AA (1971): Effects of diet on pancreatic beta cell replication in mice with hereditary diabetes. *Am J Physiol* 221:202-8.
- Chitturi S, Farrell G, Frost L, et al (2002): Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 36:403-9.
- Claycombe K, King LE, Fraker PJ (2008): A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2017-21.
- Cnop M, Hughes SJ, Igoillo-Esteve M, et al (2010): The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia* 53:321-30.
- Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, et al (2002): Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297:240-3.
- Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J (2004): Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 81:243-8.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al (1996): Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-5.
- da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Ramos MJ, Antunes A (2008): The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics* 9:119.
- Dandona P, Aljada A, Mohanty P, et al (2001): Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab* 86:3257-65.
- Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, Mantzoros CS (2010): Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol* 31:377-93.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42:1007-17.
- Degerman E, Resjo S, Landstrom TR, Manganiello V (2001): Methods to study phosphorylation and activation of the hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B in rat adipocytes. *Methods Mol Biol* 155:167-80.
- Delarue J, Magnan C (2007): Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:142-8.
- Dhillon VS, Fenech M (2013): Mutations that affect mitochondrial functions and their association with neurodegenerative diseases. *Mutat Res*.
- Diano S, Horvath TL (2012): Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends Mol Med* 18:52-8.
- Dib LH, Ortega MT, Fleming SD, Chapes SK, Melgarejo T (2013): Bone Marrow Leptin Signaling Mediates Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation in Male Mice. *Endocrinology*.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005): Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1343-51.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004): Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-6.

- Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, et al (2011): Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxid Redox Signal* 15:447-59.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005): The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415-28.
- Eipel C, Hildebrandt A, Scholz B, et al (2011): Mutation of mitochondrial ATP8 gene improves hepatic energy status in a murine model of acute endotoxemic liver failure. *Life Sci* 88:343-9.
- Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R (2008): Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 49:1894-903.
- Emanuela F, Grazia M, Marco de R, Maria Paola L, Giorgio F, Marco B (2012): Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *J Nutr Metab* 2012:476380.
- Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M (1997): Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46:313-6.
- Emre Y, Nubel T (2010): Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett* 584:1437-42.
- Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S (2008): Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134:424-31.
- Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ (2007): Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 42:1039-48.
- Fantuzzi G, Faggioni R (2000): Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 68:437-46.
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al (2009): Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15:930-9.
- Fex M, Nitert MD, Wierup N, Sundler F, Ling C, Mulder H (2007): Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 50:74-83.
- Friedman JM, Halaas JL (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-70.
- Fromenty B, Pessayre D (1995): Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 67:101-54.
- Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D (2004): The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 30:121-38.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al (2004): Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-61.
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E (2008): Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1009-17.
- Gonzalez A, Merino B, Marroqui L, et al (2013): Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual beta-cells. *Endocrinology* 154:3515-24.
- Gouspillou G, Rouland R, Calmettes G, et al (2011): Accurate determination of the oxidative phosphorylation affinity for ADP in isolated mitochondria. *PLoS One* 6:e20709.
- Graham JJ, Ryall RG, Wise PH (1980): Glycosylated haemoglobin and relative polycythaemia in diabetes mellitus. *Diabetologia* 18:205-7.
- Hadikusumo RG, Meltzer S, Choo WM, Jean-Francois MJ, Linnane AW, Marzuki S (1988): The definition of mitochondrial H⁺ ATPase assembly defects in mit- mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a monoclonal antibody to the enzyme complex as an assembly probe. *Biochim Biophys Acta* 933:212-22.
- Hanley AJ, Retnakaran R, Qi Y, et al (2009): Association of hematological parameters with insulin resistance and beta-cell dysfunction in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3824-32.
- Higgins CF (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113.
- Hirano M, Lagier-Tourenne C, Valentino ML, Marti R, Nishigaki Y (2005): Thymidine phosphorylase mutations cause instability of mitochondrial DNA. *Gene* 354:152-6.

- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al (2002): A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-6.
- Holmstrom MH, Tom RZ, Bjornholm M, Garcia-Roves PM, Zierath JR (2013): Effect of leptin treatment on mitochondrial function in obese leptin-deficient ob/ob mice. *Metabolism* 62:1258-67.
- Hotamisligil GS (2006): Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-7.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995): Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-15.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM (1994): Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4854-8.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.
- Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W (2004): The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab* 6:120-6.
- Iverson TM, Maklashina E, Cecchini G (2012): Structural basis for malfunction in complex II. *J Biol Chem* 287:35430-8.
- Jiao S, Cole TG, Kitchens RT, Pfleger B, Schonfeld G (1990): Genetic heterogeneity of lipoproteins in inbred strains of mice: analysis by gel-permeation chromatography. *Metabolism* 39:155-60.
- Jimenez-Gutierrez LR, Hernandez-Lopez J, Islas-Osuna MA, Muhlia-Almazan A (2013): Three nucleus-encoded subunits of mitochondrial cytochrome c oxidase of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA characterization, phylogeny and mRNA expression during hypoxia and reoxygenation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 166:30-9.
- Johar K, Priya A, Dhar S, Liu Q, Wong-Riley MT (2013): Neuron-specific specificity protein 4 (Sp4) bigenomically regulates the transcription of all mitochondria- and nucleus-encoded cytochrome c oxidase subunit genes in neurons. *J Neurochem*.
- Johnson RM, Goyette G, Jr., Ravindranath Y, Ho YS (2005): Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 39:1407-17.
- Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans L, et al (2009): A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *BMJ Case Rep* 2009.
- Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ (2011): Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 35:211-25.
- Jornayvaz FR, Birkenfeld AL, Jurczak MJ, et al (2011): Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5748-52.
- Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Lee HY, et al (2010): A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E808-15.
- Jornayvaz FR, Shulman GI (2012): Diacylglycerol activation of protein kinase C ϵ and hepatic insulin resistance. *Cell Metab* 15:574-84.
- Junge W, Lill H, Engelbrecht S (1997): ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem Sci* 22:420-3.
- Kagawa Y (2010): ATP synthase: from single molecule to human bioenergetics. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:667-93.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005): AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1:15-25.
- Kang K, Reilly SM, Karabacak V, et al (2008): Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR δ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 7:485-95.
- Karastergiou K, Mohamed-Ali V (2010): The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol* 318:69-78.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002): Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-50.
- Kelley DE, Simoneau JA (1994): Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94:2349-56.

- Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB (1995): The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95:2111-9.
- Kiess W, Petzold S, Topfer M, et al (2008): Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:135-53.
- Kluth O, Mirhashemi F, Scherneck S, et al (2011): Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure. *Diabetologia* 54:605-16.
- Kolesnikova OA, Entelis NS, Jacquin-Becker C, et al (2004): Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet* 13:2519-34.
- Kong CW, Hsu TG, Lu FJ, Chan WL, Tsai K (2001): Leukocyte mitochondria depolarization and apoptosis in advanced heart failure: clinical correlations and effect of therapy. *J Am Coll Cardiol* 38:1693-700.
- Koo SH (2013): Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 19:210-215.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005): The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-61.
- Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, et al (2003): Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112:1831-42.
- Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, et al (2000): Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49:1880-9.
- Kulkarni RN, Jhala US, Winnay JN, Krajewski S, Montminy M, Kahn CR (2004): PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J Clin Invest* 114:828-36.
- Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, et al (1997): Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* 100:2729-36.
- Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Van Der Velden JL, Wouters EF, Janssen-Heininger YM (2002): Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C714-21.
- Larsson NG, Luft R (1999): Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Lett* 455:199-202.
- Lavrov DV (2007): Key transitions in animal evolution: a mitochondrial DNA perspective. *Integr Comp Biol* 47:734-43.
- Lee SH, Itkin-Ansari P, Levine F (2010): CENP-A, a protein required for chromosome segregation in mitosis, declines with age in islet but not exocrine cells. *Aging (Albany NY)* 2:785-90.
- Lee TH, Kim SU, Yu SL, et al (2003): Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 101:5033-8.
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH (1994): Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10878-82.
- Li G, Gu HM, Zhang DW (2013): ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB Life* 65:505-12.
- Li YP, Atkins CM, Sweatt JD, Reid MB (1999): Mitochondria mediate tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB signaling in skeletal muscle myotubes. *Antioxid Redox Signal* 1:97-104.
- Lin Y, Berg AH, Iyengar P, et al (2005): The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280:4617-26.
- Liu J, Divoux A, Sun J, et al (2009): Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 15:940-5.
- Liu J, Li J, Li WJ, Wang CM (2013): The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2013:585897.
- Lodish H, Flygare J, Chou S (2010): From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life* 62:492-6.
- Löffler (2007): Biochemie und Pathobiochemie. 1267.
- Logan DC (2006): The mitochondrial compartment. *J Exp Bot* 57:1225-43.
- Lowell BB, Shulman GI (2005): Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-7.

- Lu Y, Xi W, Ding X, et al (2013): Citrange fruit extracts alleviate obesity-associated metabolic disorder in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mouse. *Int J Mol Sci* 14:23736-50.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007): Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175-84.
- Ma YS, Wu SB, Lee WY, Cheng JS, Wei YH (2009): Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochim Biophys Acta* 1790:1021-9.
- Maassen JA, LM TH, Van Essen E, et al (2004): Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* 53 Suppl 1:S103-9.
- MacDonald PE (2011): Signal integration at the level of ion channel and exocytotic function in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E1065-9.
- Madamanchi NR, Runge MS (2007): Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 100:460-73.
- Maedler K, Schulthess FT, Bielman C, et al (2008): Glucose and leptin induce apoptosis in human beta-cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases. *Faseb J* 22:1905-13.
- Maedler K, Sergeev P, Ehses JA, et al (2004): Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8138-43.
- Marella M, Patki G, Matsuno-Yagi A, Yagi T (2013): Complex I inhibition in the visual pathway induces disorganization of the node of Ranvier. *Neurobiol Dis* 58:281-8.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA (2002): Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407-33.
- Marroqui L, Gonzalez A, Neco P, et al (2012): Role of leptin in the pancreatic beta-cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 49:R9-17.
- Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR (1992): Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340:925-9.
- McGarry JD (2002): Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:7-18.
- Mills E, Kuhn CM, Feinglos MN, Surwit R (1993): Hypertension in CB57BL/6J mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Physiol* 264:R73-8.
- Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P (2000): Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2970-3.
- Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J (2000): Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49:1341-6.
- Mora-Garcia P, Cheng J, Crans-Vargas HN, Countouriotis A, Shankar D, Sakamoto KM (2003): Transcriptional regulators and myelopoiesis: the role of serum response factor and CREB as targets of cytokine signaling. *Stem Cells* 21:123-30.
- Morris DL, Rui L (2009): Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1247-59.
- Morris EM, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA (2011): Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis. *Antioxid Redox Signal* 15:485-504.
- Mueckler M, Thorens B (2013): The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 34:121-38.
- Nakamura A, Terauchi Y (2013): Lessons from Mouse Models of High-Fat Diet-Induced NAFLD. *Int J Mol Sci* 14:21240-21257.
- Nicholls TJ, Rorbach J, Minczuk M (2013): Mitochondria: mitochondrial RNA metabolism and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 45:845-9.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al (2009): CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15:914-20.
- Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, et al (1995): Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 136:2143-9.
- Odegaard JI, Chawla A (2013): Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science* 339:172-7.

- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al (2007): Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447:1116-20.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, et al (2008): Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 7:496-507.
- O'Dowd JF, Stocker CJ (2013): Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Front Physiol* 4:170.
- Oswal A, Yeo G (2010): Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 18:221-9.
- Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P (1985): Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57:65-73.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G (1999): Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126:5073-84.
- Palmer G, Aurrand-Lions M, Contassot E, et al (2006): Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J Immunol* 177:2899-907.
- Palumbo P, De Gaetano A (2010): An islet population model of the endocrine pancreas. *J Math Biol* 61:171-205.
- Parekh PI, Petro AE, Tiller JM, Feinglos MN, Surwit RS (1998): Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism* 47:1089-96.
- Park SH, Ryu SY, Yu WJ, et al (2013): Leptin promotes K(ATP) channel trafficking by AMPK signaling in pancreatic beta-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12673-8.
- Park WH, Kang YC, Piao Y, Pak DH, Pak YK (2012): Causal effects of synthetic chemicals on mitochondrial deficits and diabetes pandemic. *Arch Pharm Res* 36:178-88.
- Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL (1992): Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130:1459-66.
- Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG (2008): Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 8:301-9.
- Paz-Filho G, Mastronardi C, Wong ML, Licinio J (2012): Leptin therapy, insulin sensitivity, and glucose homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab* 16:S549-55.
- Perl S, Kushner JA, Buchholz BA, et al (2010): Significant human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *J Clin Endocrinol Metab* 95:E234-9.
- Pettersson US, Christofferson G, Massena S, et al (2011): Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *PLoS One* 6:e22480.
- Pintus F, Floris G, Rufini A (2012): Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany NY)* 4:734-41.
- Plum L, Ma X, Hampel B, et al (2006): Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. *J Clin Invest* 116:1886-901.
- Porat S, Weinberg-Corem N, Tornovsky-Babaey S, et al (2011): Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab* 13:440-9.
- Postic C, Girard J (2008): Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118:829-38.
- Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, et al (2005): Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146:1576-87.
- Qatanani M, Lazar MA (2007): Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21:1443-55.
- Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD (2013): Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol* 1:304-12.
- Rabilloud T, Berthier R, Vincon M, Ferbus D, Goubin G, Lawrence JJ (1995): Early events in erythroid differentiation: accumulation of the acidic peroxidoxin (PRP/TSA/NKEF-B). *Biochem J* 312 (Pt 3):699-705.

- Rak M, Tzagoloff A (2009): F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18509-14.
- Reaven GM (1988): Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-607.
- Reaven GM (1993): Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44:121-31.
- Rebuffe-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J (1993): Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 42:1405-9.
- Roberts A, Thompson JS (1976): Inbred mice and their hypbrids as an animal model for atherosclerosis research. *Adv Exp Med Biol* 67:313-327.
- Roduit R, Nolan C, Alarcon C, et al (2004): A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 53:1007-19.
- Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA (1999): Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276:E1-E18.
- Russell ES, Neufeld EF, Higgins CT (1951): Comparison of normal blood picture of young adults from 18 inbred strains of mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 78:761-6.
- Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA (1996): The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97:1111-6.
- Sakai C, Tomitsuka E, Miyagishi M, Harada S, Kita K (2013): Type II Fp of human mitochondrial respiratory complex II and its role in adaptation to hypoxia and nutrition-deprived conditions. *Mitochondrion*.
- Santidrian AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, et al (2013): Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest* 123:1068-81.
- Sauvanet C, Duvezin-Caubet S, Salin B, et al (2012): Mitochondrial DNA mutations provoke dominant inhibition of mitochondrial inner membrane fusion. *PLoS One* 7:e49639.
- Schulz N, Kluth O, Jastroch M, Schurmann A (2013): Minor role of mitochondrial respiration for Fatty-Acid induced insulin secretion. *Int J Mol Sci* 14:18989-98.
- Seufert J (2004): Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 53 Suppl 1:S152-8.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006): TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-25.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006): Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-801.
- Simmons D (2010): Increased red cell count in diabetes and pre-diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 90:e50-3.
- Singh A, Wirtz M, Parker N, et al (2009): Leptin-mediated changes in hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13100-5.
- Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, Jacobs HT (2006): Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab* 3:9-13.
- Soehnlein O, Drechsler M, Doring Y, et al (2013): Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med* 5:471-81.
- Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB (2006): Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346:739-45.
- Speakman JR, Mitchell SE (2011): Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 32:159-221.
- Stephenson EJ, Hawley JA (2013): Mitochondrial function in metabolic health: A genetic and environmental tug of war. *Biochim Biophys Acta*.
- Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE (2000): The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 10:672-9.
- Sugden MC, Holness MJ (2006): Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem* 112:139-49.
- Sugden MC, Holness MJ (2011): The pyruvate carboxylase-pyruvate dehydrogenase axis in islet pyruvate metabolism: Going round in circles? *Islets* 3:302-19.

- Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ (1998): Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 18:5457-64.
- Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, et al (1995): Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44:645-51.
- Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN (1988): Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 37:1163-7.
- Surwit RS, Seldin MF, Kuhn CM, Cochrane C, Feinglos MN (1991): Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes* 40:82-7.
- Talukdar S, Oh da Y, Bandyopadhyay G, et al (2012): Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* 18:1407-12.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al (1995): Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-71.
- Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, et al (2007): Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:246-57.
- Tom RZ, Sjogren RJ, Vieira E, et al (2011): Increased hepatic insulin sensitivity in mice lacking inhibitory leptin receptor signals. *Endocrinology* 152:2237-46.
- Trottier MD, Naaz A, Li Y, Fraker PJ (2012): Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7622-9.
- Unger RH (2000): Leptin physiology: a second look. *Regul Pept* 92:87-95.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997): Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-4.
- Valentine WN, Paglia DE (1990): Erythroenzymopathies and hemolytic anemia: the many faces of inherited variant enzymes. *J Lab Clin Med* 115:12-20.
- Valentine WN, Paglia DE (1991): Red cell metabolism, normal and abnormal implications for red cell aging. *Adv Exp Med Biol* 307:125-37.
- van den Ouweland JM, Maechler P, Wollheim CB, Attardi G, Maassen JA (1999): Functional and morphological abnormalities of mitochondria harbouring the tRNA(Leu)(UUR) mutation in mitochondrial DNA derived from patients with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) and progressive kidney disease. *Diabetologia* 42:485-92.
- van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S (2013): Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Ventre J, Doebber T, Wu M, et al (1997): Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 46:1526-31.
- Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowski AJ, Oliveira HC (2007): Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. *IUBMB Life* 59:263-8.
- Wallace DC (1999): Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-8.
- Wallace DC (2010): Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen* 51:440-50.
- Wang DQ, Paigen B, Carey MC (2001): Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J Lipid Res* 42:1820-30.
- Wang S, Dale GL, Song P, Viollet B, Zou MH (2010): AMPKalpha1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. *J Biol Chem* 285:19976-85.
- Weibust RS (1973): Inheritance of plasma cholesterol levels in mice. *Genetics* 73:303-12.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003): Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-808.
- Weiss H, Wester-Rosenloef L, Koch C, et al (2012): The mitochondrial Atp8 mutation induces mitochondrial ROS generation, secretory dysfunction, and beta-cell mass adaptation in conplastic B6-mtFVB mice. *Endocrinology* 153:4666-76.
- Wellen KE, Hotamisligil GS (2005): Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-9.
- Wilke MS, French MA, Goh YK, Ryan EA, Jones PJ, Clandinin MT (2009): Synthesis of specific fatty acids contributes to VLDL-triacylglycerol composition in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia* 52:1628-37.

- Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH (2010): Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol* 41:256-66.
- Wu SB, Wu YT, Wu TP, Wei YH (2013): Role of AMPK-mediated Adaptive Responses in Human Cells with Mitochondrial Dysfunction to Oxidative Stress. *Biochim Biophys Acta* 1840:1331-44.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al (2003): Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-30.
- Yang JN, Seluanov A, Gorbunova V (2013): Mitochondrial Inverted Repeats Strongly Correlate with Lifespan: mtDNA Inversions and Aging. *PLoS One* 8:e73318.
- Yin K, Liao DF, Tang CK (2010): ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport. *Mol Med* 16:438-49.
- Yu X, Gimsa U, Wester-Rosenlof L, et al (2009a): Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res* 19:159-65.
- Yu X, Wester-Rosenlof L, Gimsa U, et al (2009b): The mtDNA nt7778 G/T polymorphism affects autoimmune diseases and reproductive performance in the mouse. *Hum Mol Genet* 18:4689-98.
- Zhang C, Allegretti M, Vonck J, et al (2013): Production of fully assembled and active Aquifex aeolicus FF ATP synthase in Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* 1840:34-40.
- Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS (2002a): Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 51:2929-35.
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008): Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135:61-73.
- Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel RL (2002b): Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R226-34.
- Zhang ZW, Cheng J, Xu F, et al (2011): Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. *IUBMB Life* 63:560-5.
- Zhao XM, Du WH, Wang D, et al (2011): Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Mol Reprod Dev* 78:942-50.
- Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, et al (2011): Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res* 20:481-9.

Thesen

- 1) Das Metabolische Syndrom umfasst ein in westlichen Industrieländern häufig auftretenden Symptomkomplex aus Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämien, Atherosklerose, Hypertonie und Steatosis hepatis. Die Insulinresistenz sowie Insulinsekretionsstörung der β -Zellen des Pankreas gelten als wesentliche pathogenetische Faktoren für das metabolische Syndrom.
- 2) In den β -Zellen des Pankreas und den insulinempfindlichen Geweben (Leber, Muskel, Fettgewebe), spielt der mitochondriale Stoffwechsel eine zentrale Rolle in der Signalgenerierung für Sekretionsprozesse und Speicherung von Nährstoffen.
- 3) Für die β -Zellen des Pankreas ist ATP das Hauptsignal zur Auslösung der nährstoffinduzierten Insulinsekretion. Dabei sind die Mitochondrien zentraler Bildungsort des ATP, was sie beim Metabolismus der Glucose und Lipide generieren. Mutationen der Atmungskettenkomplexe können daher Störungen der β -Zellfunktion zur Folge haben. In der Promotionsarbeit wurden die Auswirkung einer *mt-Atp8*-Genmutation im ATP-Synthasekomplex auf die β -Zellfunktion und Suszeptibilität gegenüber der Ausbildung metabolischer Störungen im conplastischen Mausmodell der B6- mt^{FVB} Maus untersucht.
- 4) Mitochondrien verfügen über ein eigenes Genom, welches unter anderem für insgesamt 13 Untereinheiten der Atmungskette, darunter das *mt-Atp8-Gen*, kodiert. Für eine korrekte Assemblierung und Funktionsweise der ATP-Synthase ist das *mt-Atp8-Gen* von essentieller Bedeutung. Dieses wurde im genutzten Modell über Rückkreuzung auf den Maushintergrundstamm C57BL6 (B6) übertragen.
- 5) Das mitochondriale Genom des Kontrollstamms B6- mt^{AKR} und des B6- mt^{FVB} Stamms mit der Mutation unterscheidet sich durch einen Polymorphismus an nur einer Stelle im *mt-Atp8-Gen*. Somit war eine genaue Untersuchung des Einflusses des Polymorphismus möglich. Dabei scheint die Mutation im *mt-Atp8-Gen* verantwortlich für die erhöhte Suszeptibilität gegenüber metabolischer Störungen zu sein.

- 6) Zur Untersuchung der Auswirkung der Mutation auf den Metabolismus und Kompensationsfähigkeiten des Mausstammes wurde eine metabolische Belastung mit einer hochkalorischen Diät durchgeführt. Dafür erhielten die Tiere über einen Zeitraum von sechs Monaten jeweils eine Hochfettdiät (60 % kcal aus Fett) oder eine Kontrolldiät (10 % kcal aus Fett).
- 7) Die *Atp8*-Mutation führte im Stamm B6-*mt*^{FVB} zu einer schnellen Entwicklung einer Hyperinsulinämie und Insulinresistenz. Der AKR Kontrollstamm konnte hingegen die metabolische Belastung durch eine effektivere Steigerung der Insulinsekretion kompensieren.
- 8) Unter Hochfettdiät über sechs Monate zeigten die B6-*mt*^{FVB} Tiere geringere Zunahmen der β -Zellmasse im Vergleich zu den B6-*mt*^{AKR} Tieren, die mit einer signifikanten Zunahme der β -Zellmasse auf den gesteigerten Insulinbedarf reagierten.
- 9) Die *mt-Atp8-Gen*-Mutation führte trotz geringerer Gewichtszunahme zu erhöhten Leptinspiegeln im Serum, in Korrelation zu einer höheren Fettmasse. Die mitochondriale Mutation bewirkte somit eine gestörte adipo-insuläre Interaktion zwischen Leptin und Insulin.
- 10) Tiere mit einer *mt-Atp8-Gen*-Mutation zeigten unter Hochfettdiät im Serum niedrigere Cholesterinkonzentrationen, aber signifikant höhere Triglyceridkonzentrationen als die B6-*mt*^{AKR} Tiere der Kontrollen. Mit fortschreitender Dauer der Hochfettdiät konnte keine Eskalation der Dyslipidämien beobachtet werden.
- 11) Die Mutation im *mt-Atp8-Gen* begünstigt die Ausbildung einer Steatosis hepatis. Die Prädisposition zur Fetteinlagerung war bereits unter einer normokalorischen Kontrolldiät erkennbar.
- 12) Männliche Tiere beider Stämme lagerten signifikant mehr intrahepatische Lipide ein als die weiblichen Tiere. Da intrahepatische Lipide in Zusammenhang mit der hepatischen Insulinsensitivität stehen, führt der Geschlechtsdimorphismus vermutlich bei den männlichen Tieren zu einer schnelleren Entwicklung einer hepatischen Insulinresistenz.

- 13) Hämatologisch zeigten beide Stämme vergleichbare Immunzellpopulationen im Differentialblutbild, die innerhalb des Referenzbereiches lagen. Das *mt-Atp8-Gen* führte unter Hochfettdiät nicht zu einer systemischen Inflammation.
- 14) Die Mutation eines einzelnen Gens der mtDNA hat somit einen deutlichen Einfluss auf die Adaptation der β -Zellmasse und der Lebersteatose unter Adipositas. Hierbei ist die Suszeptibilität im frühen Lebensalter am höchsten. Die Suszeptibilität für die Lebersteatose scheint unabhängig von Inflammationsstatus des Fettgewebes zu sein.
- 15) Die Daten sprechen für eine besondere Beachtung von Lebersteatosen bei mitochondrialen Mutationen im OXPHOS System unter den Bedingungen einer Adipositas im Kindes- und Jugendalter.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Markus Tiedge danke ich für die Überlassung des Themas, seine sehr hilfreiche Unterstützung, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und die viele Zeit, die er hierfür zur Verfügung stellte.

Frau Dr. Heike Weiss danke ich für die umfangreiche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, die immer wieder die Motivation an dieser Arbeit gefördert hat.

Frau Lisa Heye danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche, hilfreiche und anregende Ideen.

Frau Agnes Kerschies danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Terminkoordination, die vielen lieben Telefonate und Gespräche in ihrem Büro.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit und die aufmunternden Gespräche bei kleinen Hindernissen.

Bei allen Tierpflegern bedanke ich mich für die tägliche Betreuung der Versuchstiere.

Herrn Dr. Christoph Pflugfelder danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und Lösung von Problemen bei der Erstellung der Promotionsarbeit.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und das rege Interesse am Fortgang der Arbeit, die Motivation und Bekräftigung. Vielen lieben Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion vorgelegte Arbeit mit dem Titel „*Einfluss der mitochondrialen Atp8-Mutation des Atmungskettenkomplex V (ATP Synthase) im B6-mt^{FVB} Mausstamm auf metabolische Kompensationsmechanismen nach Applikation einer Hochfettdiät*“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Tiedge selbstständig durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertationsschrift angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt oder die vorliegende Dissertation vorgelegt.

Tobias Wilfer

Rostock, 27.02.2015